CHEMIE UND EIGENSCHAFTEN VON PLACENTA-KOLLAGENEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mohamed Zainal Abedin
aus Bangladesh

Berlin 1978

CHEMIE UND EIGENSCHAFTEN VON PLACENTA-KOLLAGENEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mohamed Zainal Abedin
aus Bangladesh

Berlin 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent : Professor Dr.Dr. h.c. R. Riemschneider

2. Referent : Professor Dr. G. Ruban

Tag der mündlichen Prüfung : 20.3.1978

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider

am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider, an dieser Stelle für das der Arbeit entgegengebrachte große Interesse und für die Hilfe herzlich zu danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. G. Ruban, der mich durch wertvolle Ratschläge unterstützt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	6
2.	Placenta als Organ des Stoffaustausches unter besonderer Berücksichtigung menschlicher Placenten	8
3.	Inhaltsstoffe der Placenta	10
3.1.	Kollagen und Vitamin C als Inhaltsstoffe der Placenta	19
4.	Extraktion und Reinigung von löslichen Kollagenen aus Rinderplacenten	29
4.1.	Vorversuche zur Extraktion von löslichen Kollagenen	29
4.2.	Herstellung löslicher Placenta - Kollagene	30
4.3.	Effekt von pH , Temperatur , Fremdstoff und proteolytischen Enzym auf die Extraktion löslicher Kollagene	37
5.	Charakterisierung von Kollagenen	40
5.1.	Bestimmung des Stickstoffs und des Hydroxyprolins	40
5.2.	Gehalt an Kohlenhydrat, Tyrosin und Hexosamin	43
5.3.	Gesamtaminosäureanalyse	51
5.4.	Transmissionselektronenmikroskopie	59
5.5.	Rasterelektronenmikroskopie	72
5.6.	Infrarot-Spektroskopie	77
5.7.	Molekulargewichtsbestimmung	82

Seite

6.	Eigenschaften von Kollagenen	87
6.1.	Viskosität	87
6.2.	Optische Drehung	89
6.3.	Denaturierung und Renaturierung	90
6.4.	Wiederlöslichkeit	96
6.5.	Stabilisierung des Kollagens	96
6.6.	Komponenten	105
6.7.	Ultrazentrifugation	116
7.	Über den Zusammenhang zwischen Kollagen und Vitamin C in Humanplacenta	123
8.	Präparative Arbeitsvorschriften	137
9.	Zusammenfassung	148
10.	Literaturverzeichnis	155

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Lösliche Kollagene verschiedener Provenienz wurden in den letzten Jahren in zunehmendem Maße untersucht , im hiesigen Arbeitskreis vor allem lösliche Kollagene aus Haut von Kalbsembryos.

In der vorliegenden Arbeit soll die Isolierung , Reinigung und Charakterisierung von löslichen Kollagenen aus Placenta-Kollagenen beschrieben werden . Über Placenta- Kollagene gibt es bisher nur analytische Arbeiten (56, 149) . Präparative Versuche über Kollagene aus Placenten und Untersuchungen über lösliche Placenta-Kollagene liegen nicht vor . Aus unten näher zu erläuternden Gründen stehen bei unseren präparativen Arbeiten über lösliche Kollagene Rinderplacenten im Vordergrund . Für einige analytische Untersuchungen an Placenta - Kollagenen werden menschliche Placenten herangezogen .

Im Rahmen der Untersuchungen über die Chemie und Eigenschaften von löslichen Kollagenen aus Rinderplacenten werden verschiedene Arbeitsmethoden und Analyseverfahren verwendet . Zunächst war zu prüfen , welche Extraktions - und Reinigungsverfahren zur Isolierung und Reinigung von Kollagen aus Rinderplacenten am geeignetsten sind . Es werden verschiedene lösliche Kollagene wie z.B. Tropokollagene , Segment-Long-Spacing -Kollagene (SLS-Kollagene) und enzymgelöste Kollagene hergestellt .

Die Identifizierung der Präparate erfolgt zunächst durch Anwendung von Gefriertrocknung , Gesamtaminosäureanalyse , prozentuale Bestimmung von Stickstoff und Hydroxyprolin usw.

Zur weiteren Charakterisierung der hergestellten Kollagene sollen dienen : Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) , Raster - elektronenmikroskopie (SEM) , Infrarotspektroskopie , Molekular-

gewichtsbestimmung , Acrylamid-Gel-Elektrophorese , Viskositäts-messungen , Bestimmung der optischen Drehung , Carboxymethyl-Cellulose - Chromatographie und Ultrazentrifugation .

Nachdem heute als sicher anzusehen ist , daß L-Ascorbinsäure bei der Kollagen-Biosynthese eine Rolle spielt (67) , soll auch dem Zusammenhang zwischen Kollagen – und Vitamin C-Gehalt von Placenten in Abhängigkeit vom Alter nachgegangen werden . Diese Untersuchungen werden an menschlichen Placenten durchgeführt , da hier eine genaue Altersbestimmung der beschaffenen Placenten im Bereich von 27 bis 40 Wochen möglich war .

Bevor über die Ergebnisse zur Chemie und Eigenschaften von löslichen Rinderplacenta-Kollagenen (Abschnitt 4, 5, 6,8) bzw. den Zusammenhang zwischen Gesamt -Kollagen – und Vitamin C– Gehalt menschlicher Placenta (Abschnitt 7) berichtet wird , werden Ausführungen über Placenta als Organ , über ihre Funktionen und Inhaltsstoffe sowie allgemeine Informationen über Kollagene und Vitamin C vorangestellt (Abschnitt 2 u. 3) .

2. Placenta als Organ des Stoffaustausches unter besonderer Berücksichtigung menschlicher Placenten(90a)

Die Placenta ist ein hochdifferenziertes Organ , das der Atmung und Ernährung der Frucht und dem Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus dient . Außerdem ist die Placenta eine hochwirksame Drüse mit innerer Sekretion . Sie bewältigt als " Zwischenorgan auf Zeit " zwischen Mutter und Kind vielfältige Funktionen , obgleich sie nur für kurze Zeit angelegt wird und bald wieder verschwindet .

Die Abgabe fetaler Stoffwechselschlaken erfolgt ebenfalls über die Placenta . Die Placenta ist nicht nur eine ausschließlich nach Diffusionsgesetzten arbeitende Membran , sie ist auch aktiv an den Stoffwechselprozessen beteiligt . Die Placenta hat also die Funktion zu leisten, die im erwacsenen Organismus Atmungsorgane , Darmkanal, Leber und Niere durchführen .

Am Ende der Grävität ist der Mutterkuchen ein flaches , scheibenförmiges schwammiges Organ von kreisrunder , ovaler und unregelmäßiger Form . Die Placenta besteht aus fetalem und mütterlichem Gewebe . An dem geborenen Mutterkuchen unterscheidet man eine fetale Seite , die während der intrauterinen Zeit der zugekehrt ist , und eine materne Fläche , die im Uterus der Gebärmutterwand anhaftet . Die fetale Seite zeigt die Ansatzstelle der Nabelschnur und ist von dem glatten, durchsichtigen Amnion bedeckt , das die chorialen Gefäße durchscheinen läßt .

In der Placenta fließen fetales und mütterliches Blut dicht aneinander vorbei , getrennt durch extrem dünne Scheidewände , die den Stoffaustausch bewerkstelligen . Diese Stoffwechselmembran hat eine Dicke von 20 bis 30 µ bei der jugendlichen und von 2 bis 5 µ bei der reifen Placenta , so daß die Austauschvorgänge mit fortschreitender Reife der Placenta schneller ablaufen können .

Die Kreisläufe von Mutter und Kind sind getrennte selbstständige Systeme . Der Austausch von Näherstoffen zwischen kindlichem und mütterlichem Kreislauf hat eine Analogie in den Vorgängen des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe beim Einzelindividuum. So werden diese Prozesse auch von analogen physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten beherrscht . Der Austausch von Blutgasen , Wasser, Kristalloiden und niedermolekularen Stoffen erfolgt im wesentlichen durch Diffusion . Als allgemeine Regel kann man angeben , daß Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 350 durch Diffusion übertragen werden . Die Permeabilität der Placenta für diffundierende Stoffe hängt in gewissen Grenzen von der Anzahl und der Beschaffenheit der trennenden Gewebesschichten zwischen den beiden Kreisläufen ab . Für viele Substanzen ist nachgewiesen worden , daß Placenta die Fähigkeit zur Speicherung und Synthese besitzt , daß sie also aktiv an den Stoffwechselvorgängen beteiligt ist .

Der Aufbau der Placenta zeigt beim Menschen und bei den verschiedenen Tierarten große Unterschiede . Je nach der Zahl der Schichten , die das mütterliche und fetale Blut trennen , werden epithelio-choriale, syndesmo-choriale , endothelio-choriale , hämo-choriale und hämo-endotheliale Placenten unterschieden . Bei der Rinderplacenta handelt es sich um eine epithelio-choriale und bei der menschlichen Placenta um eine hämo-choriale Placenta .

3. INHALTSSTOFFE DER PLACENTA

Seit den ersten umfassenden Untersuchungen über die Biochemie der Placenta durch Abderhalden (1919) und andere Autoren hat sich die chemische Methodik rasch verfeinert , was auch der Erforschung der Chemie der Placenta zugute kam .

In der Placenta ist eine große Menge verschiedener anorganischer und organischer Inhaltsstoffe nachgewiesen worden .

Der Wassergehalt von Placenta nimmt mit zunehmender Entwicklung ab (90) . Der reife bluthaltige menschliche Placenta enthält 82,3-85,5 % Wasser (89) . Nach Mischel (94) beträgt der Wassergehalt ca. 88% zu Beginn der Grävität , sinkt bis zum 7. Monat an , um vom 8. Monat an konstant zu bleiben .

Der Trockenrückstand der Placenta beträgt 17% zu Beginn der Grävität und 13 % zu Ende der Grävität (132).

Der Gehalt der Placenta an Glukosamin bzw. gebundene Hexosen beträgt im Gesamthomogenat 65 bzw. 309 , im Zellkernen 36 bzw. 266 , Mitochondrien 47 bzw. 320 , Mikrosomen 99 bzw. 870 (155) (Zahlenwerte bedeuten N/mg Gewebe) .

Die nachfolgende Zusammenstellung will einen Überblick auf die Vielzahl der in Humanplacenten gefundenen Substanzen geben : Tabelle 1 und 2 . Leider gibt es für die in dieser Arbeit ebenfalls behandelten Rinderplacenten keine entsprechen umfassende Literatur.

Tabelle 1. In Placenten gefundene Inhaltsstoffe

(Humanplacenten)

Inhaltsstoffe	Menge			Bestimmt in Placenta (Bemerkung)	Literatur
	%	mg%	µg%		
CaO	0,5-0,6			Trockensubstanz	(167)
	1,21				(89)
Ca		86,38		normalreif	(92)
		96,80		bluthaltig	(93)
		31,0		jung	(91)
		98,0		reif	(91)
$P_{anorg.}$		150		reif	(97)
P_{gesamt}		765		reif	(97)
$P_{unlösl.}$		73,70		reif	(36)
$P_{lösl.}$		73,90		reif	(36)
$P_{org.}$		49,30		reif	(36)
K		43,67		bluthaltig	(95)
		21,60		entblutet	(95)
Mg		8,87		normalreif (Mittelwert)	(96)
Cl		2,80		normalreif	(97)
S		96,90		normalreif	(97)
Fe		16-20		normalreif	(80)
Zn		6,13		normalreif	(98)
Cu		0,245	245	Frischsubstanz	(99)
		1,240	1240	Trockensubstanz	(99)

Inhaltsstoffe	Menge			Bestimmt in Placenta (Bemerkung)	Literatur
	%	mg%	µg%		
Cu		0,121	121	Frischsubstanz	(143)
		0,706	706	Trockenmaterial	(143)
Mn		0,03			(92)
Al					(92)
Ba				(als	
Li				Spurenelemente	
Ni				nachgewiesen)	
Ti					
Pb					
Ag					
B					
Si					
As					
D-Glukose	98			mütterliches Blut	(54)
	49			fetales Blut	(54)
L-Fruktose	1,9			normalreif	(103)
Hexosamin als Glukosamin	11,o			normalreif	(103)
Galaktose	8,2			normalreif	(103)
Mannose	74,6			normalreif	(103)
Glykogen		100		normalreif	(153)
Gesamtfett	12,36			normalreif	(133)

Inhaltsstoffe	Menge			Bestimmt in Placenta (Bemerkung)	Literatur
	%	mg%	µg%		
Neutralfett	3,51			normalreif	(133)
Lipoide	8,85			normalreif	(134)
Lipide		246		Placentablut	(5)
		740		mütterliches Blut	(5)
Phosphatide		145,2		Placentablut	(123)
		329,7		mütterliches Blut	(123)
Gesamt-stickstoff		1317,20		Trockensubstanz	(92)
Reststick-stoff		385,30		Trockensubstanz	(92)
Cystin		1,83		normalreif	(80)
Tyrosin		5,26		normalreif	(80)
Tryptophan		2,37		normalreif	(80)
Arginin		1,83		normalreif	(80)
Histidin		13,06		normalreif	(80)
Hydroxypro-lin	2,3-2,57			normalreif (Trockengewicht)	(85)
	2,46-2,60			normalreif (Trockengewicht)	diese Arbeit (S.125)
Glykokoll				(als	(55)
Valin				Aminosäure	(55)
Leucin				nachgewiesen)	(89)
Prolin					(32)
Phenylalanin					(32)

Inhaltsstoffe	Menge			Bestimmt in Placenta (Bemerkung)	Literatur
	%	mg%	µg%		
Glutaminsäure				(als	(32)
Asparaginsäure				Aminosäure	(169)
Lysin				nachgewiesen)	(169)
Kollagen	17,04-19,03				(85)
	18,23-19,25			normalreif (Trockengewicht)	diese Arbeit (S.134)
Carotin			29-30	Rohsubstanz	(43) (126)
			12	Rohsubstanz	(112)
Vitamin A			6,60	Rohsubstanz	(43)
			7,57	Rohsubstanz	(112)
Aneurin, frei			5,0-	Rohsubstanz	(110)
			7,7	Rohsubstanz	(111)
				Rohsubstanz	(42)
				Rohsubstanz	(61)
				Rohsubstanz	(126)
			15	Rohsubstanz	(132)
Aneurin, total			33,1	Rohsubstanz	(114)
			47,0	Rohsubstanz	(132)
Co-Carboxylase			27,8	Rohsubstanz	(114)
			32,0	Rohsubstanz	(132)
Lactoflavin, gesamt			168-320	Rohsubstanz	(113)
			151	Rohsubstanz	(132)

Inhaltsstoffe	Menge			Bestimmt in Placenta (Bemerkung)	Literatur
	%	mg%	µg%		
Laktoflavin, gesamt			214	Rohsubstanz	(87)
Laktoflavin, frei	40-55,5			Rohsubstanz	(116)
	36			Rohsubstanz	(132)
Nicotylamid		1,99		Rohsubstanz	(132)
Nicotylsäureamid		1,40		Rohsubstanz	(100)
Pantothensäure			279	Rohsubstanz	(132)
Biotin			1,6	Rohsubstanz (fest gebunden)	(132)
			0,4	Rohsubstanz (locker gebunden)	(132)
Vitamin B_{12}	48			Rohsubstanz	(31)
L-Ascorbinsäure		12-40		normalreif	(117)
		4,5-37,5		normalreif	(118)
		5,o		normalreif	(3)
		12-40		normalreif	(164)
		4-17		normalreif	(131)
		16,3-46		normalreif	(104)
		10,1		normalreif	(101)
		11,3		normalreif	(69)
		4,7-21,0		normalreif	(10)

Inhaltsstoffe	Menge			Bestimmt in Placenta (Bemerkung)	Literatur
	%	mg%	µg%		
L-Ascorbin-		4,43		normalreif	(19)
säure		12,8		normalreif	(39)
		17-20		normalreif	diese Arbeit (S.134)
Vitamin E			526	(Mittelwert)	(1)
			800	(Mittelwert)	(7)
			408	(Mittelwert)	(115)
Acetyl-cholinchlorid		16,8-21,1		Frischgewebe	(13)
		7,4 - 14,1		Frischgewebe	(59)
Acetylcholin		1,5-13,3		Frischgewebe	(41)
		30,0		Frischgewebe	(12)
Oestron			51,3	Frischsubstanz	(27)
Progesteron		0,1		Rohsubstanz	(148)
		0,1-0,3		Rohsubstanz	(124,125)
		0,1-0,15		Rohsubstanz	(120)
		0,163		Rohsubstanz	(58)
Oestradiol			170,2	Frischsubstanz	(27)
Oestriol			314,6	Frischsubstanz	(27)

Ein großer Anzahl von Enzymen wurden in menschlichen Placenten nachgewiesen . Im folgenden wird eine tabellerische Übersicht der nachgewiesenen Enzymen , die soweit möglich nach dem Enzym-schlüssel geordnet sind , dargestellt (Tabelle 2)

Tabelle2. In Placenten gefundene Enzyme(geordnet nach Enzymschlüssel)

E.C.Nummer	Enzym	Bemerkung	Literatur
1.2.3.2	Xanthinoxydase	nachgewiesen	(77)
1.3.99.1	Succinat-dehydrogenase	nachgewiesen	(78)
1.4.3.4	Monoaminooxydase	isoliert	(156)
1.4.3.6	Histaminase	nachgewiesen	(162)
1.9.3.1	Cytochromoxydase	nachgewiesen	(79)
2.5.1.2	Thiaminase I	nachgewiesen	(23)
2.7.7.16	Ribonuclease	nachgewiesen	(136)
3.1.1.3	Lipasen	nachgewiesen	(6,64)
3.1.1.8	Cholinestarase	nachgewiesen	(63)
			(170)
3.1.3.1	Alkali Phosphatase	isoliert	(152)
			(105)
			(144)
3.1.3.2	Säure Phosphatase	isoliert	(152)
3.1.3.5	5-Nucleotidase	nachgewiesen	(90)
3.1.3.10	Glukose 1-Phosphatase	nachgewiesen	(136)
3.1.4.5	Desoxyribonuclease	nachgewiesen	(152)
			(18)

E.C.Nummer	Enzym	Bemerkung	Literatur
3.2.1.1	α-Amylase	nachgewiesen	(82) (106)
3.2.1.2	ß- Amylase	nachgewiesen	(22) (83)
3.2.1.20	α-Glukosidase	nachgewiesen	(82)
3.2.1.21	ß- Glukosidase	nachgewiesen	(82)
3.2.1.26	Invertase	nachgewiesen	(88) (2)
3.2.2.1	Nucleosidase	isoliert	(159)
3.4.4.14	Fibrinolysin	nachgewiesen	(171)
3.5.1.2.	Glutaminase	nachgewiesen	(86)
3.5.1.4	Amidase	nachgewiesen	(2)
3.5.1.5	Urease	nachgewiesen	(2)
3.5.3.1	Arginase	nachgewiesen	(168)
3.5.99.2	Thiaminase II	nachgewiesen	(23)
4.1.1.1	α - Carboxylase	nachgewiesen	(88)
4.2.99.1	Hyaluronidase	nachgewiesen	(172)

3.1. Kollagen und Vitamin C als Inhaltsstoffe der Placenta

Kollagen und Vitamin C sind die in dieser Arbeit behandelten Inhaltsstoffe der Placenta . 1955 haben Harkness und Harkness (56) über das Wachstum von Kollagen in Fetus , Placenta und fetalen Membran von Ratten berichtet. Diese Arbeit war rein analytisch und enthält , wie bereits erwähnt,keine präparativen Angaben über die Isolierung von Kollagen .

i) Kollagen : Die Angaben zur Beteiligung des Bindegewebes beim Aufbau der Placentarzotten in Abhängigkeit vom Alter der Gravidität beruhen ausschließlich auf histologischen Untersuchungen . Bourne (16)beschreibt die kompakte Schicht des Amnions (Compact layer) als Gitterfaserfaszikel vor verschiedener Dicke . In der Schicht des Chorions laebe reticularis (reticulum layer) plazieren sich feine und grobe Gitterfasern. Von diesen Schichten haben Verbeck u. Mitarb. (163) mit dem Elektronenmikroskop nachgewiesen , daß sie Kollagen enthalten . Sowohl im Amnion als auch im Chorion laeve befinden sich Fibroblasten an den kompakten und reticulären Schichten .

Kollagen — das mengenmäßig bedeutendste Protein des menschlichen Organismus — hat Faserstruktur und ist ein wesentlicher Bestandteil der Haut , der Sehnen sowie der Grundsubstanz von Knorpel und Knochen und ist schließlich als fein verästeltes Netzwerk fast überall im Extrazellulärraum höherer Organismen anzutreffen .

Die Bildung des Kollagens erfolgt in der Fibroblasten in einem mehrstufigen Vorgang . Zuerst wird an Polyribosomen eine Polypeptidvorstufe , die als Protokollagen bezeichnet wird , gebildet . Durch Hydroxylierung von Prolin - und Lysinresten (Protokollagen -Hydroxylase) wird das Protokollagen in das Prokollagen umgewandelt . Aus diesem Prokollagen wird als letzter Schritt am N-terminalen Ende eine Polypeptid abgespalten , es entsteht das Tropokollagen .

Durch Extraktion mit kalter neutraler Salzlösung läßt sich aus Bindegewebsfasern eine Lösung des Tropokollagens - neutralsalzlösliches Kollagen - oder durch Behandlung mit verdünnter Säure - säurelösliches Kollagen - gewinnen . Eine weitere Menge des Kollagens kann erst nach Anwendung des genannten Extraktionsverfahren mit proteolytischem Enzym in Lösung gebracht werden : Enzymgelöstes Kollagen .

Tropokollagen , die lösliche Form des Kollagens , ist ein ziemlich starres , stabähnliches Teilchen , das - als eine "asymmetrische oder strukturell polarisierte " Einheit aufgefaßt wird , d.h. die Dichteverteilung in der Längsrichtung ist so , daß das ein Ende von dem anderen klar unterschiedbar ist . Chrakteristisches Merkmal der Kollagenmoleküle sind deutlich hervortretende Querstreifungen in einem Abstand von etwa 700 Å , denen eine spezifische Anordnung ihrer Bausteine zugrunde liegt. Diese Bausteine , die einzelnen Kollagenmoleküle , besitzen die Form eines festen Stäbchens mit einem Durchmesser von 15 Å und einer Länge von 2800 Å . Die Periodizität der Querstreifung der Mikrofibrillen wird damit erklärt , daß die einzelnen Kollagenmoleküle parallel zueinander aggregieren . Das Kollagenmolekül , auch Tropokollagen genannt , besteht aus drei jeweils etwa 1000 Aminosäuren langen Polypeptidketten ; die drei Ketten sind zusätzlich um eine gemeinsame , zentrale Achse in Uhrzeigerrichtung nochmals zu einer Übergeordneten Schraube verdrillt: Tripelhelix-Konfiguration .
Diese Tripelhelix-Konfiguration wird durch Wasserstoffbrücken zwischen C=O und NH-Gruppen benachbarter Ketten und esterähnlichen Bindungen innerhalb des Moleküls stabilisiert . Es gibt drei Typen von Kollagenmonomeren , die nur im denaturierten Zustand unterschiedbar und in bestimmten Verhältnis in einer Kollagenart anwesend sind . Als erste fanden Orekhovich und Shpikiter (121,122) , das sauerextrahiertes , denaturiertes Kollagen der Rattenhaut sich in der Ultrazentrifuge in

zwei Komponenten trennt : in den schneller sedimentirenden ß-Anteil und in den langsameren α-Anteil . Durch verfeinerte Ultrazentrifugentechnik konnte schließlich die γ- Komponente, die noch schneller als der ß-Anteil sedimentiert , gefunden werden (45). Vergleiche der Molekulargewichte dieser verschiedenen Sedimentationskomponenten zeigen , daß der α-Anteil (MG ca. 100000) der Polypeptidkette entspricht . Die ß-Komponente (MG ca. 200000) und die γ -Komponente (MG ca. 300000) sind zwei bzw. drei kovalent über Wasserstoffbrücken verbundene α- Komponenten.

Von den drei Ketten sind nach Untersuchungen von Piez et al (127,128) zwei , die mit α_1 bezeichnet werden , in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch . Die dritte α_2 genannt , unterscheidet sich dagegen von den anderen beiden .

Kommt eine Vernetzung zwischen zwei α_1-Komponenten vor , so spricht man von einer $ß_{11}$-Komponente ; besteht die Vernetzung zwischen einer α_1-und einer α_2-Komponente , wird das entstandene Dimer als $ß_{12}$ bezeichnet . Das Tropokollagen besteht aus zwei α_1-Ketten und einer davon verschiedenen α_2-Kette und daher kann seine Zusammensetzung $\left[(\alpha_1)_2\alpha_2\right]$ bezeichnet werden (157) .
Daneben treten noch Doppelketten (ß) auf , die durch kovalente Verbindung zweier α-Ketten entstehen , als etwa $ß_{11}$ oder $ß_{12}$-Komponente. Nur bei stark vernetzten Kollagenen kann man $ß_{22}$ finden , da ja dann 2 Tropokollagenfasern quervernetzt sein müssen , oder γ-Ketten, die aus drei Brücken verbundenen α-Ketten bestehen , etwa γ_{112} (Abb. 1) . In Abb. 2 ist die schematische Darstellung zur Entstehung einer α-Kette zu entnehmen.
Der ungewöhnliche Aufbau der Helix des Kollagens wird weitgehend durch ihre ungewöhnliche Aminosäurezusammensetzung erklärt. Über fast die gesamte Polypeptidkette stellt Glycin jede dritte Aminosäure dar , weshalb Kollagen als Polymer von Tripeptideinheiten mit der Formel - $(\text{Gly-Pro-X-})_n$ bezeichnet werden kann (Gly = Glycin ,

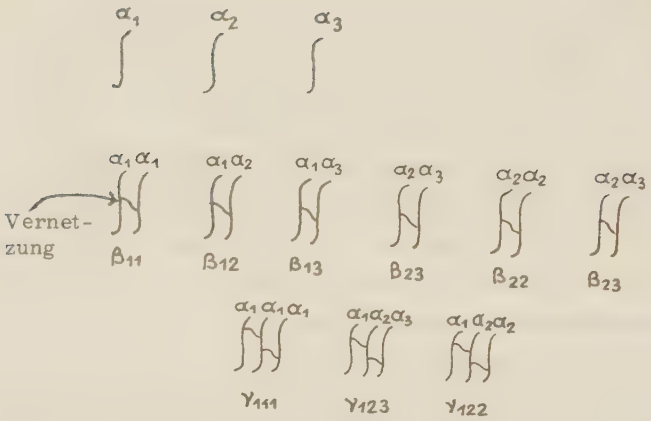


Abb. 1. Schematische Darstellung der Entstehung der Kollagenkomponenten

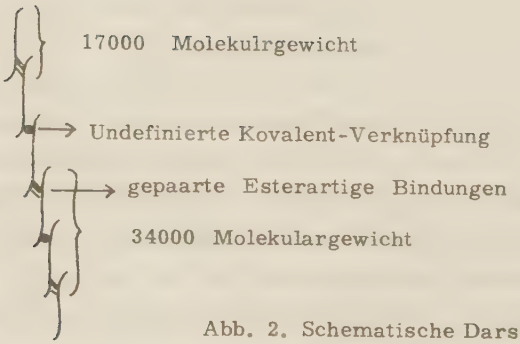


Abb. 2. Schematische Darstellung einer α -Kette (135)
(6x17000= 102000 Molekulargewicht)

Pro = Prolin und X = jede beliebige Aminosäure) . Das wichtigste Tripeptid der gesamten Kollagenstruktur hat die Sequenz Glycin-Prolin - Hydroxyprolin (44) .

Der Gehalt an Glycin im Kollagen (33% der Aminosäurereste) unterscheidet es von allen anderen Proteinen mit Ausnahme des nahe verwandten Faserproteins Elastin . Weitere außergewöhnliche Eigenschaften des Kollagens sind der hohe Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin. Der Hydroxyprolingehalt der Säugetierkollagenen beträgt 13,5% . Die Bestimmung von Hydroxyprolin ist somit eine viel verwendete Methode zur Ermittlung des Kollagengehaltes eines Gewebes .

Zum Schluß soll die Biosynthese des Kollagens kurz erörtert werden. Bei der Kollagen-Biosynthese wird zunächst ein Hydroxyprolinfreies- als Protokollagen bezeichnetes Protein gebildet , dessen Prolin - und Lysinresten durch eine Protokollagen-Hydroxylase teilweise in Hydroxyprolin bzw. in Hydroxylysin umgewandelt werden . Dabei wirken zwei Enzyme , die jeweils für Prolin und Lysin (Prolinhydroxylase und Lysinhydroxylase) spezifisch sind . Für die Hydroxylierungsreaktion sind als Co-Faktoren L-Ascorbinsäure , F^{+2}-Ionen , α- Ketoglutarat und molekularer Sauerstoff wichtig . Das Produkt der erfolgten Hydroxylierung ist das Prokollagen . Für die Modifikation des Prokollagens durch Glykosation ist Hydroxyprolin ein essentieller Vorläufer . An den Hydroxylgruppen des Hydroxylysins findet eine spezifische Anlagerung von Glukose — und Galactoseresten staat , die anscheinend eine Voraussetzung für die Sekretion des Kollagens aus der Zelle darstellt . Außerhalb der Fibroblasten werden die Prokollagene am N-terminalen Ende durch eine spezifische Protease verkürzt (154) . Auf diese Weise entsteht das Tropokollagen . Die Verkürzung ist eine Voraussetzung für die nachfolgende spontane Bildung der Fibrillen . Die Vorgänge sind in der Abb. 3. dargestellt . Das neugebildete Kollagen ist leicht löslich. Mit zunehmendem Alter des Kollagens findet eine fortschreitende Vernetzung zwischen den Peptidketten statt.

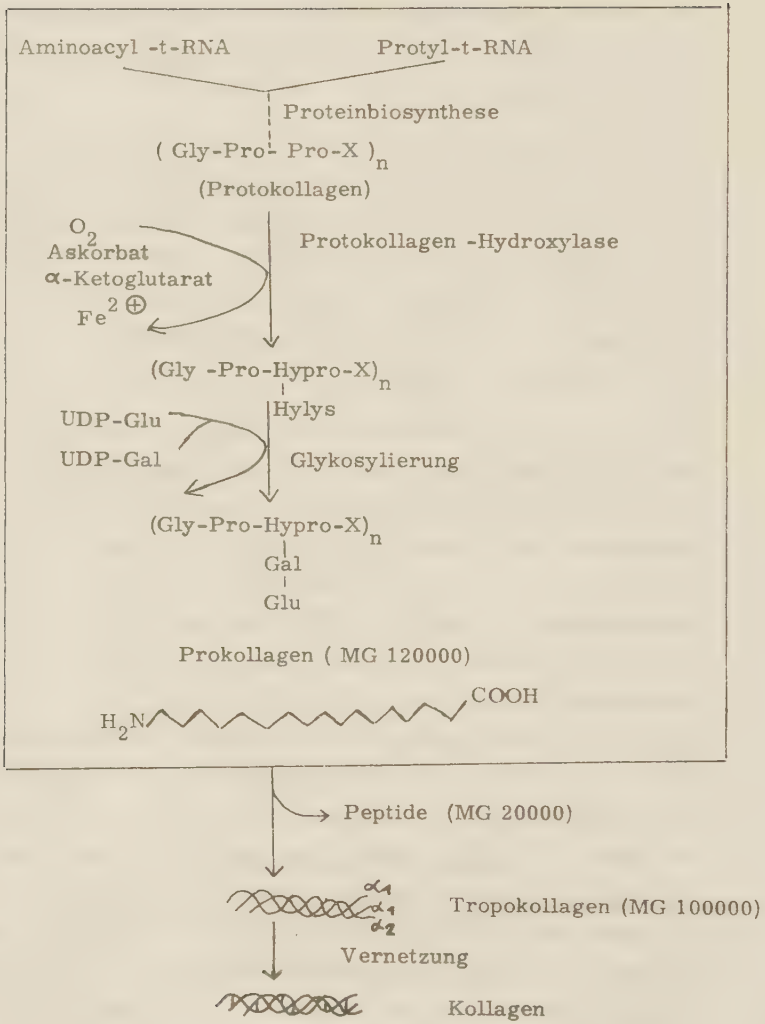


Abb. 3. Schema der Biosynthese des Kollagens (20, 84) .

ii) Vitamin C : Histologisch konnten Tonutti u. Mitarb. (160) in der menschlichen Placenta Vitamin C sowohl in den Stroma als auch in den Syncytiumzellen finden . Sie haben dabei die Dezidua als echten Speicher bezeichnet , da eine relativ konstante Menge an Vitamin C vorhanden ist .

Nach Untersuchungen von Hozaepfel und Barnes (65) findet sich die höchste Konzentration an Ascorbinsäure im Syncytium der Zotten. Kasabyan (68) stellte Schwankungen während der Schwangerschaft fest. Smyth u. King (151) berichteten über den Nachweis einer Ascorbinsäure-Synthese in Organen der Ratte (Leber , Niere, Gehirn , Muskulator) bei Analysen in vitro. Barnes et al (10) führten gleichartige Untersuchungen mit menschlicher Placenta durch , konnten jedoch , wie zu erwarten , keine Vitamin C-Synthese feststellen . L-Ascorbinsäure ist nur für Mensch , Primaten , Meerschweinchen und einige Vogelarten ein Vitamin +) ist , d.h. diese Tierarten können kein Vitamin C synthetisieren .

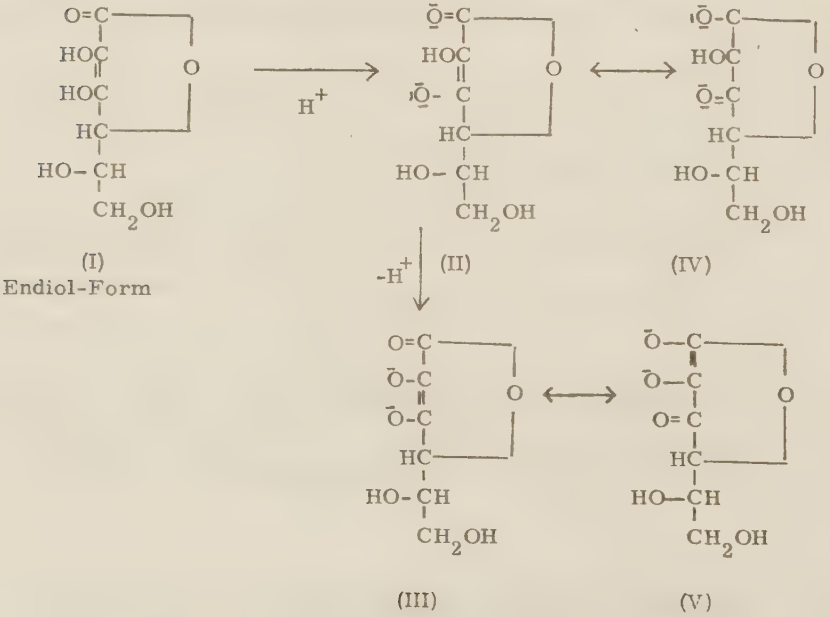
Der L-Ascorbinsäure-Gehalt von Humanplacenten (nichtdefinierten Alters) wurde in den Jahren 1935-1950 von verschidenen Autoren bestimmt : 4,0-40,0 mg% (Tab. 1 , S. 15, 16).

Im folgenden sollen einige wichtige Eigenschaften von L-Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure diskutiert werden , die für die Analytik von Wichtigkeit sind . Die Chemische Bestimmunsmethoden nützen charakteristische chemische Reaktion für eine Erfassung des Vitamins C aus (145). Die Analysemethoden zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Gesamt-Vitamin C-Gehalt in der vorliegenden Arbeit beruhen auf den reduzierenden Eigenschaften von L-Ascorbinsäure (Reaktion der Endiol Gruppe) oder auf den kondensierenden Eigenschaften und der

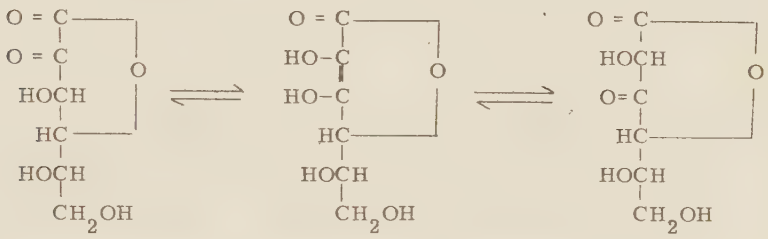
+) Vitamine sind Stoffe , die einem Organismus in kleiner Menge mit der Nahrung zugeführt werden müssen und die aktiv in den Stoffwechsel eingreifen.

Farbstoffbildung (Reaktion der 2,3-Diketo-Gruppierung) des Oxydationsmittel der L-Ascorbinsäure.

Physikalisch-chemische Ascorbinsäurebestimmungsmethoden beruhen auf der Verwertung der charakteristischen physikalischen Konstanten des Vitamins , wie z.B. der charakteristischen Absorption im ultravioletten oder sichtbaren Bereich oder des Redoxpotentials(24). Ascorbinsäure löst sich leicht in Wasser (ca. 30g/100ml) und ist in unpolaren organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich. Die wässrige Lösungen reagieren stark sauer. Der pH-Wert einer 2.proz.-Lösung (0,1136M) beträgt ca. 2,5. Als zweiwertige Säure bildet Ascorbinsäure zwei Anionen II und III , die nach H. v. Euler und B. Eistert mit mesomeren Formen IV und V im Gleichgewicht stehen .

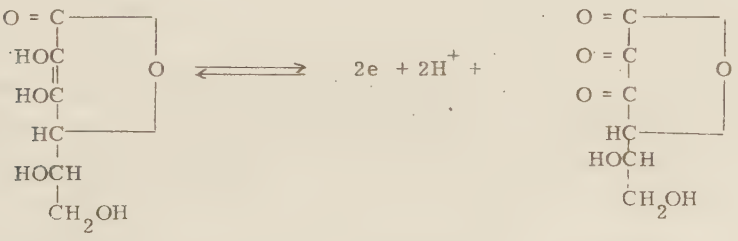


Die Ascorbinsäure gehört zu einer Gruppe ungesättigter Endiole , die auch als Reduktone bezeichnet werden . Gleichgewichtszustände in Ascorbinsäure Lösungen können zwischen der Eidiol-Form (I) und zwei Ketoformen (IIa und IIb) auftreten . In wäßriger Lösung herrscht auf Grund des UV-Absorptionsspektrums die Form (I) vor .



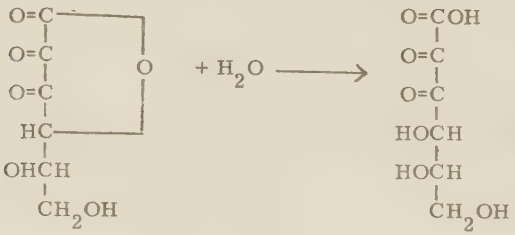
(IIa) (I = L-Ascorbinsäure) (IIb)

Die Ascorbinsäure besitzt wie sämtliche Endiole stark reduzierende Eigenschaften und wird reversible zu Dehydroascorbinsäure (VI) oxydiert. Als Oxydationsmittel können Sauerstoff , Jodlösung , 2,6-Dichlorphenolindophenol , Methylenblau , Kaliumferricyanid u.m. verwendet werden. Die Dehydroascorbinsäure ist in sauerer Lösung unterhalb pH 4,0 beständig in alkalischer Lösung zersetzt sich rasch . Die Oxydation der Ascorbinsäure wird durch Spuren von Schwermetallen , insbesondere durch Cu, Ag, Fe katalysiert [35] .



(I) (VI)

Die Dehydroascorbinsäure (VI) wird hydratisiert und in neutraler oder alkalischer Lösung zu der biologisch unwirksamen 2,3-Diketogulonsäure (VII) hydrolysiert .



(VI) (VII)

In vorliegender Arbeit wird unter Gesamt-Vitamin C-Gehalt die Summe von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure verstanden . Die 2,3-Diketogulonsäure wird nicht berücksichtigt , da der Gehalt von natürlicher Untersuchungsmaterialen an Diketogulonsäure im Vergleich zum Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure-Gehalt in der Regel sehr gering und die Diketogulonsäure biologisch inaktiv ist .

Die Dehydroascorbinsäure ist in kleinen Mengen ein ständiger Begleiter der Ascorbinsäure in der Natur , da sie iher primäres Oxydationsprodukt ist . Sie ist biologisch der Ascorbinsäure beinahe gleichwertig (zum Unterschied von der unwirksamen 2,3-Diketogulonsäure , die wie bereits erwähnt , durch Hydratisierung der Dehydroascorbinsäure und Öffnung ihres Laktonringes ensteht).

Die Probleme der Unbeständigkeit der Ascorbinsäure interessierte viele Autoren vom Gesichtspunkt der Stabilisierung unter den veränderlichen Bedingungen des Milieus bei analytischen und technischen Arbeiten .

4. EXTRAKTION UND REINIGUNG VON LÖSLICHEN KOLLAGENEN AUS RINDERPLACENTEN

Über die Extraktion und Reinigung von Kollagenen verschiedenster Provenienz gibt es eine umfangreiche Literatur , an die wir hier anknüpfen können (30, 49, 50, 51, 53, 66, 73, 74, 75) . In unserem Institut wird, wie bereits erwähnt , seit längerer Zeit über die präparative Gewinnung von löslichen Kollagenen gearbeitet.
Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollagene werden aus Rinderplacenten hergestellt. Dieses Ausgangsmaterial macht die präparative Darstellung von Placenta-Kollagenen in größeren Maßstaben möglich, da Rinderplacenten in einer großen Menge zur Verfügung stehen.

4.1. Vorversuche zur Extraktion von löslichen Kollagenen

Bei der Anwendung der allgemein üblichen Methoden sowie unter Berücksichtigung der im Institut zur Isolierung von Kalbshautkollagenen verwendeten Methoden zur Isolierung von löslichen Kollagenen aus Rinderplacenta lassen sich keine ausreichend reinen löslichen Kollagene gewinnen. Da Placenta eine große Menge von Inhaltsstoffen besitzt , stellt die Trennung von Fremdstoffen bzw. Fremdeiweißen von Kollagen ein großes Problem dar Es erschien zweckmäßig , eine Vorbehandlung der frischen Placenten zur Abtrennung vieler Bestandteile vorzunehmen , etwa von der Art wie man sie zur Gewinnung von Placenta-Extrakten durchführt (139).
Entsprechende Vorversuche zeigten, daß eine Vorbehandlung[+)] zerkleinerter Rinderplacenten mit organischen Lösungsmitteln bei niedriger Temperatur vorteilhaft ist und zur Abtrennung vieler Bestandteile führt. Durch Hydroxyprolinbestimmung[++)] wurde festgestellt , daß Kollagene dabei nicht oder in minimaler Menge extrahiert wurden.

+) Zerkleinerte Rinderplacenta nach Vorbehandlung enthielt den Index " Vorbehandelte Placenta "

++) Hydroxyprolinbestimmung : vgl. S.41

Die so vorbehandelte Placenten erschien nun als ein geeignetes Ausgangsmaterial für die hier beabsichtigten Extraktionsversuche. Die unvorbehadelte Placenten als Ausgangsmaterial einzusetzen erschien von vornherein wenig sinnvoll, da zur Kollagengewinnung eine Lösung, die möglichst wenige Fremdstoffe enthält, verwendet werden soll.

4.2. Herstellung löslicher Placenta-Kollagene

Ein eingehendes Literaturstudium zeigt, daß zur Isolierung und Reinigung von löslichen Kollagenen im wesentlichen drei Verfahren angewandt werden und zwar unterscheidet man zweckmäßig zwischen neutralsalzlöslichen, säurelöslichen und enzymgelösten Kollagenen (vgl. Schema der Abb. 4).

Neutralsalzlösliches Kollagen wird durch Extraktion des Ausgangsmaterials im neutralen pH-Bereich, säurelösliches Kollagen durch Extraktion mit säuren Lösungsmitteln gewonnen. Das enzymgelöste Kollagen läßt sich durch Extraktion im neutralen und sauren pH-Bereich unter Zusatz von proteolytischen Enzymen, wie z.B. Pepsin, Trypsin oder Pronase gewinnen.

Zur Gewinnung von löslichen Kollagenen aus Rinderplacenten wurde eine große Anzahl von Extraktionsversuchen unternommen: Tab. 4, 5, 6.
Je ein Beispiel zur Isolierung von neutralsalzlöslichen, säurelöslichen und enzymgelösten Kollagenen wird nachfolgend beschrieben. Weitere Versuche zur Extraktion und Reinigung von Placenta-Kollagenen findet man im Kapitel 8. Eine Zusammenstellung über die wichtigsten hergestellten Kollagen-Präparaten aus Rinderplacenten zeigt die Tabelle 3.

A. Neutralsalzlösliches Kollagen: Die vorbehandelte Placenten (200g) wurden zuerst dreimal mit dest. Wasser sorgfältig gewaschen und dann gefriergetrocknet. Danach wurden sie zwei Tage bei 4°C dreimal mit vierfacher Menge (800ml) 0,45M bzw. 0,5MNaCl oder 0,05M Tris/HCl, 0,15M NaCl-Lösung unter Rührung extrahiert. Die Einwirkung von Bakterien wurde durch Zusatz von Toluol verhütet. Nach der Extraktion wurde das Homogenat bei 2200 x g, 40 Min. zentrifugiert.

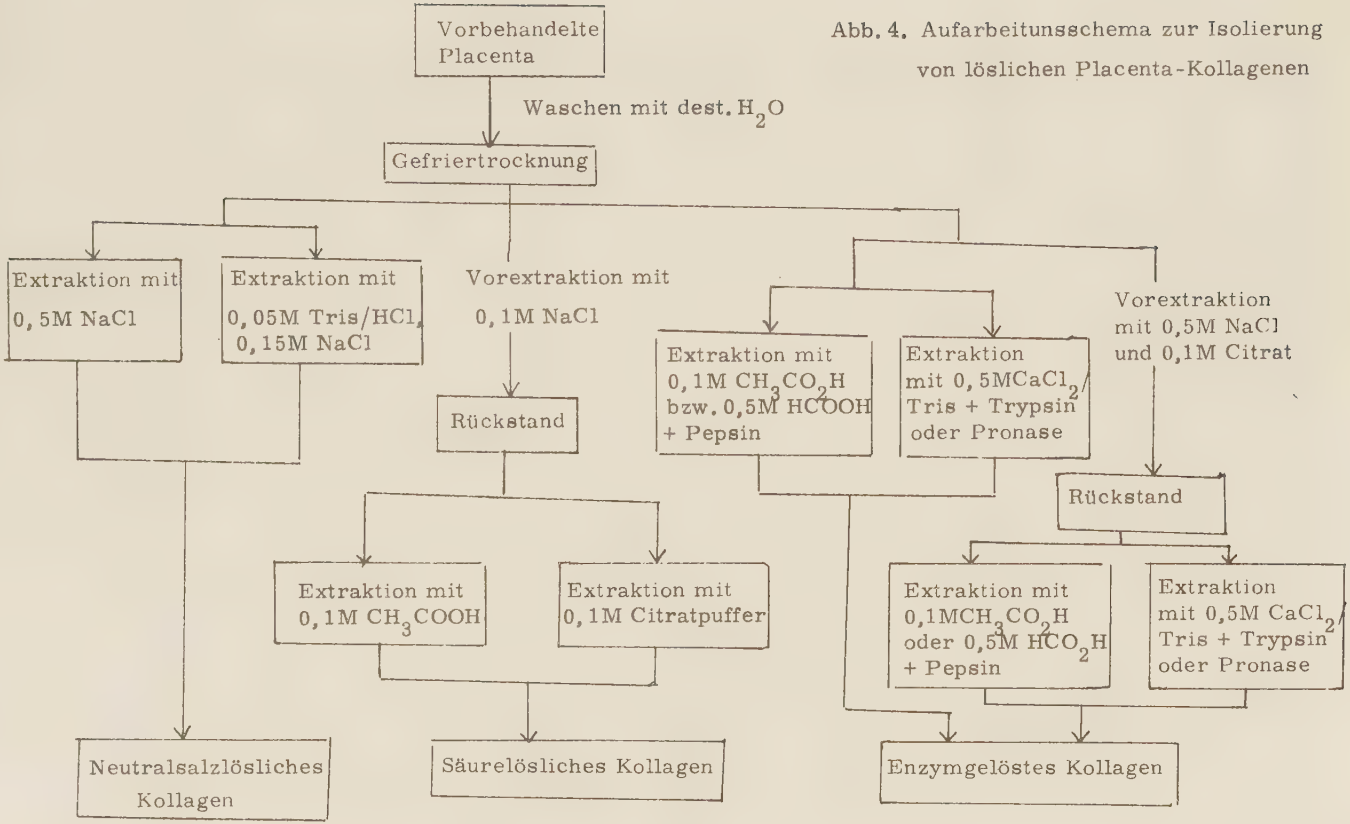


Abb. 4. Aufarbeitunsschema zur Isolierung von löslichen Placenta-Kollagenen

Tab. 3. Zusammenstellung der aus Rinderplacenten hergestellten löslichen Kollagen - Präparate (S. 137-147)

Typ	Präparat Nr.	Extraktionsmittel	Reinigung über
Säurelösliche Kollagene	K_1	0,1M CH_3COOH	Fibrillen
"	K_1S	"	Segmente
"	K_2	0,1M Citrat Puffer	Fibrillen
"	K_2S	"	Segmente
"	K_4	0,2M Citrat Puffer	Fibrillen
"	K_4S	"	Segmente
"	K_9	0,1M CH_3COOH	Fibrillen
"	K_{10}	0,15M CH_3COOH	Fibrillen
Neutralsalz-	K_3	0,5M NaCl	Fibrillen
lösliche Kollagene	K_3S	"	Segmente
"	K_5	0,2M NaCl	Fibrillen
"	K_5S	"	Segmente
Pepsingelöste Kollagene	K_6	0,1M CH_3COOH	Fibrillen
	K_6S		Segmente
"	K_7	0,5M CH_3COOH	Fibrillen
"	K_7S	"	Segmente
"	K_8	0,5M HCOOH	Fibrillen
"	K_8S	"	Segmente
"	K_{11}	0,5M CH_3COOH	Fibrillen

Durch Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes der Lösung wurde die extrahierte Kollagenmenge ermittelt (Tab. 4). Die Lösung(200ml) wurde dann weiter bei 18000 xg, 30 Min. klar zentrifugiert, mit festem NaCl zu einer Endkonzentration von 20 Gew% versetzt und 15 Std. bei 4°C stehen gelassen. Das ausgefällte Kollagen wurde dann in 500ml 0,5M CH_3COOH gelöst und zentrifugiert. Nach Zugabe von NaCl zu 7 Gew% fiel das Kollagen aus. Das Präzipitat wurde dann wieder in 300ml 0,1M Essigsäure gelöst und gegen dest. Wasser eine Woche lang dialysiert. Das ausgeschiedene Kollagen wurde dann mit Wasser aufgeschlämmt und gefriergetrocknet . Ausbeutenangaben : Tab. 4.

B. Säurelösliches Kollagen : Die gefriergetrocknete vorbehandelten Placenten (300g) wurden zuerst 24 Std. lang bei 4°C in 600ml 0,1M NaCl extrahiert. Nach Zentrifugieren wurden die Rückstände zwei Tage bei 4°C dreimal mit vierfacher Menge (1200 ml) 0,1M bzw. 0,5M Essigsäure oder 0,1M Citratpuffer unter Rührung extrahiert. Der Zusatz von Toluol verhütete die Einwirkung von Bakterien. Nach der Extraktion wurde die Lösung von dem Ungelöten bei 2200 x g, 40 Min. abzentrifugiert. Die extrahierte Kollagenmenge wurde durch Hydroxyprolinbestimmung in der Lösung ermittelt (Tab. 4). Die Lösung (2,5l) wurde dann bei 20000 x g, 30 Min. klar zentrifugiert. Durch Zugabe von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 7 Gew% wurde das Kollagen ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 700ml 0,1M Essigsäure gelöst. Nach Zentrifugieren wurde die Lösung ca. 7 Tage gegen dest. Wasser dialysiert und danach gefriergetrocknet.

C. Enzymgelöstes Kollagen : Eine bedeutende Menge löslicher Kollagene aus Rinderplacenten wurde durch Extraktion im saurem bzw. neutralen Bereich isoliert. Eine weitere Menge ließ sich durch Einwirkung von proteolytischen Enzymen wie z.B. Pepsin, Trypsin , Pronase in Lösung bringen : Tabelle 4a, 5, 6 .

i) Pepsingelöste Kollagene : Zur Gewinnung der pepsingelösten Kollagene aus Rinderplacenten wurden die Extraktionsversuche ohne eine Vorbehandlung (Tab . 4a) oder mit einer Vorbehandlung mit verschiedenen Extraktio-

Tabelle 4 . Extrahierbare Kollagene von Rinderplacenten (4^0C)

Extraktionsmittel	Zahl der Extraktion	Extraktions-dauer	Lösliches Roh-Kollagen extrahiert %
0,45 NaCl, pH 7,0	1	48	0,30
0,45 NaCl, pH 7,0	3	72	0,44
0,5M NaCl ,pH 7,2	4	96	0,55
0,5M NaCl, pH 7,2	2	60	0,35
0,05M Tris / HCl, ,15 M NaCl, pH 7,2	2	48	0,48
0,1M CH_3COOH , pH 2,9	2	48	0,35
0,1M CH_3COOH , pH 2,9	3	72	0,43
0,5M CH_3COOH , pH 3,0	1	48	0,40
0,5M CH_3COOH , pH 3,0	3	72	0,54
0,1M Citrat-Puffer, pH 3,5	2	48	0,37
0,1M Citrat-Puffer , pH 3,7	2	48	0,40
0,2M Citrat- Puffer , pH 3,6	2	48	0,45

nsmitteln unternommen (Tab. 5). Es erwies sich als zweckmäßig, zunächst durch Vorbehandlung die neutralsalzlöslichen und die säurelöslichen Kollagene abzutrennen. Die vorbehandelten Placenten(400g) wurden zuerst mit dest. Wasser dreimal gewaschen und mit verschiedenen Extraktionsmitteln 24 Std. bei 4°C vorbehandelt und das ungelöste Material abzentrifugiert. Das entstandene Rückstand (330g) wurde dann mit vierfacher Menge 0,5M CH_3COOH bei 24°C unter Zusatz von Pepsin (Kollagen:Enzym =50:1) 24 Std. extrahiert und anschließend zunächst 50 Min. bei 14000 x g, und dann 1 Std. bei 40000 x g klar zentrifugiert. Durch Hydroxyprolinbestimmung wurde die isolierte Kollagenmenge in der Lösung ermittelt : Tab. 5 . Das Kollagen wurde durch mehrmalige Dialyse gegen 0,02M Na_2HPO_4 abgeschieden und gereinigt und abschließend gefriergetrocknet .

Tab. 4a. Einfluß proteolytischer Enzyme auf die Kollagenextraktion (ohne Vorbehandlung)

Extraktionsmittel	pH	Zugegebene Enzym	Kollagen : Enzym	Temp. (°C)	Lösliche Rohkollagen extrahiert(%)
1. 0,5M HCOOH	2,0	Pepsin	100:1	24	0,70
			50:1	24	0,80
			25:1	24	0,95
			20:1	24	0,94
2. 0,1M CH_3CO_2H	2,9	Pepsin	25:1	24	1,05
			20:1	24	0,98
3. 0,1M Citrat-Puffer	4,8	Papain	25:1	20	0,50
4. 0,5M $CaCl_2$/ Tris	8,0	Pronase	20:1	20	0,55
		Trypsin	20:1	20	0,59

Tab. 5. Kollagen-Solubilisierung durch Einwirkung von Pepsin nach Vorbehandlung

Art der Vorbehandlung	%Kollagen gelöst nach Vorbehandlung	Lösliches Rohkollagen extrahiert nach Pepsinbehandlung (LM=0,5M CH_3COOH , pH 3,0 ; $20^{\circ}C$ (%)
1. Keine	-	0,89
2. 0,2M Phosphat +0,5M Harnstoff	0,32	0,95
3. 0,1M Citratpuffer (dreimal)	0,65	0,83
4. 0,5M NaCl , 0,1M Citratpuffer	0,28 0,30	0,95
5. 0,1M NaOH	0,08	1,15
6. 0,1M Essigsäure + Pepsin	0,85	0,70
7. 0,5M $CaCl_2$/Tris + Trypsin	0,51	0,86

ii) Trypsin oder Pronase gelöste Kollagene :Die vorbehandelte Placenten (400g) wurden nach dem Waschen mit dest. Wasser gefriergetrocknet. Danach wurden sie mit verschiedenen Extraktionsmitteln 24 Std. bei $4^{\circ}C$ vorbehandelt. Nach der Vorbehandlung wurden die Rückstände (300g) bei 2200 x g , 40 Min. abzentrifugiert und dann mit Trypsin (oder Pronase)-zusatz (Kollagen : Enzym = 50 :1) in 0,05M $CaCl_2$/Tris, pH 8,0 , 2o Std. lang bei $2o^{\circ}C$ unter Rühren extrahiert . Die isolierte Kollagenmenge in der Lösung wurde durch Hydroxyprolinbestimmung ermittelt : Tabelle 6 .

Nach der Zentrifugieren bei 22000g 50 Min. wurde die Lösung zur Abtrennung des Enzyms zunächst gegen 0,05% ige Essigsäure , dann gegen Citrat - Puffer , pH 3,7 und zuletzt gegen dest. Wasser dialysiert . Beim letzten Schritt fällt das Kollagen in Form von Fibrillen aus , während das Enzym in Lösung bleibt . Das ausgeschiedene Kollagen wurde dann mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet .

Tabelle 6 . Kollagen- Solubilisierung durch Einwirkung von Trypsin und Pronase nach Vorbehandlung (Lösungsmittel : 0,05 M $CaCl_2$/Tris , pH 8,0 ; 20^0C) .

Art der Vorbehandlung	% Kollagen gelöst nach Vorbahandlung	% Lösliches Rohkollagen extrahiert unter Zusatz von	
		Trypsin	Pronase
Keine	-	0,48	0,40
0,1M Citrat-Puffer	0,60	0,40	0,43
0,5M NaCl	0,32	0,51	0,55
0,1M Essigsäure	0,40	0,48	0,42

4.3. Effekt von pH , Temperatur , Fremdstoff und proteolytischen Enzym auf die Extraktion löslicher Kollagene :

Wie in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt worden ist , können lösliche Kollagene aus Rinderplacenten mit verschieden Extraktionsmitteln extrahiert werden . Die Extraktionseffektivität verschiedener Lösungsmittel ist etwas unterschiedlich . Dabei spielen eine Rolle : pH des Lösungsmittels , Extraktionstemperatur und Anwesenheit von Fremdstoffen während der Extraktion .

a) Effekt der Änderung von pH und Temperatur auf die Kollagen-Extraktion

Die vorbehandelten Placenten wurden nach Waschen und Gefriertrocknung mit Hilfe verschiedener Extraktionsmittel 48 Std. bei verschiedener Temperatur und pH extrahiert . Nach der Extraktion wurden die Lösungen abzentrifugiert und der Hydroxyprolin-Bestimmung unterworfen .
Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengestellt .

Tabelle 7. Effekt von pH und Temperatur auf die Kollagen - Extraktion .

Lösungsmittel	Temp. (^{0}C)	pH	Lösliches Rohkollagen extrahiert (%)
1. 0,1M Essigsäure	4	2,9	0,29
	25	2,9	0,34
2. 0,1M Citrat -	4	3,7	0,25
Puffer	25	3,7	0,35
3. 0,05M Tris/HCl,	4	7,5	0,34
0,15 M NaCl	25	7,5	0,30
4. 0,5M NaCl	4	7,2	0,37
	25	7,2	0,31
			(Mittelwert aus 4 Bestimmung)

Beim pH im sauren Bereich ist die Kollagen -Extraktion besser bei 25 ^{0}C und im neutralen Bereich bei 4^{0}C , d. h. höhere Temperatur bei Extraktion im sauren Bereich und kältere Temperatur bei Extraktion im neutralen pH -Bereich .

b) Effekt von Fremdstoff - Zusatz :

Im folgenden geht es um den Zusatz von Fremdstoffen bei der Extraktion von löslichen Kollagenen durch verschiedene Extraktionsmittel. Als Extraktionsmittel dienten 0,5M NaCl , pH 7,2 , 0,1M Essigsäure , pH 2,9 , und 0,1M Citrat - Puffer , pH 3,7 .

Die gefriergetrockneten vorbehandelten Rinderplacenten wurden 48 Std . bei 4^0C in dreifacher Menge Lösungsmittel unter Zusatz von Glukose , Ascorbinsäure und Harnstoff verschiedener Konzentration extrahiert . Danach wurden die Lösungen klar zentrifugiert und die extrahierte Kollagenmenge durch Bestimmung von Hydroxyprolin ermittelt . Die bisher durchgeführten Extraktionsversuche deuten darauf hin , daß die Kollagen-Extraktion durch Fremdstoff - Zusatz nur im neutralen pH - Bereich etwas verbessert werden können .

c) Einfluß von proteolytischem Enzym auf die Kollagen - Extraktion :

Eine bessere Ausbeute von löslichem Kollagen wurde durch enzymatische Solubilisierung ermöglicht . Die Solubilisierung von Kollagen durch die Einwirkung von proteolytischem Enzym steht im Zusammenhang mit dem Problem der Umwandlung von reifem Kollagen in lösliches Kollagen . Von allen Enzymen , deren Einwirkung zur Extraktion von Placenta - Kollagenen untersucht wurde , war der Solubilisierungseffekt von Pepsin bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen am besten : Tab. 4, 4a, 5, 6.

5. CHARAKTERISIERUNG VON KOLLAGENEN

Zur Charakterisierung der aus Rinderplacenten hergestellten Kollagen-Präparate wurden die nachstehenden Untersuchungen durchgeführt .

5.1. Bestimmung des Stickstoffs und des Hydroxyprolins

i) Bestimmung von Stickstoff : 25 bis 30mg eines gereinigten und gefriergetrockneten Kollagen -Präparates werden in den Kjeldahlkolben überführt . Dazu werden noch 0,1g vom Selenreaktionsgemisch[+)] und 7 bis 8ml konz. Schwefelsäure hinzugegeben . Jetzt wird der Kolben in der Aufschlußapparatur (Gerhardt) ca. 30 Min. bei Stufe III erhitzt . Ist die Lösung noch nicht klar , werden noch ein paar Tropfen Perhydrol hinzugesetzt . Wieder wird der Kolben erwärmt , bis die Lösung klar ist . Die abgekühlte Aufschlußlösung wird jetzt in die Pernass-Wagner-Apparatur überführt und mit einigen ml 33%iger NaOH , der ein paar Tropfen Mischindikator[++)] zugesetzt sind , versetzt . Mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation wird das freigesetzte Ammoniak in eine Vorlage mit 5ml 0,1N H_2SO_4 überdestilliert (ca. 15 Min.) . Die nichtverbrauchte Schwefelsäure wird mit 0,1N NaOH zurücktitriert .

Auswertung : (Beispiel / Kollagen-Präparat Nr. 1)

Der Anteil an Stickstoff in Prozent errechnet sich wie folgt :
Verbrauch an 0,1N NaOH = 1,9 ml , Verbrauch an 0,1N H_2SO_4 = (5-1,9) = 3,1 ml ; Die Einwaage des Kollagens beträgt 25,6 mg .

1ml 0,1N H_2SO_4 = 1,4007 mg N
3,100ml 0,1N H_2SO_4 = X mg N

X = 4,342 mg N

+) Ein Selenreaktionsgemisch enthält, z.B. 90% HgO und 10% SeO_2 . Das Gemisch darf auch eine Spatelspitze Kaliumsulfat und 2-3mg Selen enthalten.
++) Mischindikator: 0,1g Bromkresolgrün Indikator und 0,02g Methylindikator werden in 100ml abs. EtoH gelöst .

25,6 mg Kollagen enthält 4,342 mg N .

25,6 mg = 100 %

4,342 mg = X %

X = 16,96 % ; Das Kollagen-Präparat enthält 16,96 % N.

Der N-Gehalt der hergestellten Kollagen-Präparate lag etwas tiefer als der von reinen aschefreien Kollagenen (Tabelle 8).

ii) Bestimmung von Hydroxyprolin : Die Hydroxyprolin-Bestimmung erfogte mit Hilfe der Methode von Leach (81), Neumann und Logan (108) und unter Berücksichtigung einiger in unserem Institut ausgearbeiteter Modifikationen (142).

Die Arbeitsvorschrift ergibt sich folgendermaßen :

a) Hydrolyse der Kollagen-Präparate : Die gefriergetrocknete Kollagen-Präparate wurden durch 24 Std. Erhitzen bei 110^0C mit HCl in einem Schmelzrohr hydrolysiert wobei im Falle der festen Kollagen-Präparate 6N HCl und im Falle der Kollagenlösung 12N HCl (Verdünnung 1:1) zu verwenden ist . Nach der Hydrolyse wurden die Hydrolysate im Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet und mit Wasser auf eine Konzentration von 5 bis 15 ug Hydroxyprolin /ml gebracht .

b) Zur Methode : Die Methode zur Bestimmung von Hydroxyprolin in Placenta-Kollagen beruht auf der Oxydation von Hydroxyprolin mit H_2O_2 unter der katalytischen Wirkung von $CuSO_4$ in 2,5N NaOH ; das überschüssige H_2O_2 wird durch Erwärmen auf 70^0C zerstört und das entstandene Pyrrol ohne Isolierung nach dem Ansäuren mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in Propanollösung kondensiert (in Gegenwart von H_2SO_4). Die Färbung wird in Spektralphotometer bei 560nm gemessen.

c) Ausführung der Bestimmung :

Reagenzien:

0,05M $CuSO_4$ Lösung in Wasser ;

2,5N NaOH : 100g Natriumhydroxyd -Plätzen auf 1L Wasser ;

Tabelle 8 . Stickstoff - und Hydroxyprolin -Gehalt einiger verschieden gereinigter Kollagen - Präparate aus Rinderplacenten (Tab. 3.).

Lösliche Kollagen-Präparate (S. 137-147)	Stickstoff Gew%	Hydroxyprolin Gew%
Säurelösliche Kollagene(Tab. 3)		
K_1	16,96	11,80
K_1S	17,00	12,80
K_2	16,70	11,05
K_2S	16,90	12,90
K_4	16,89	12,40
K_9	16,90	11,25
K_{10}	17,00	12,15
Neutralsalzlösliche Kollagene (Tab. 3)		
K_3	17,00	12,00
K_5	16,00	10,45
K_5S	16,80	11,00
Pepsingelöste Kollagene (Tab. 3)		
K_6	16,60	12,80
K_6S	17,12	12,90
K_7	16,75	10,80
K_8	17,00	9,80
K_{11}	16,60	12,00

Bemerkung : Lösliches Kollagen (rein, aschefreie) aus Kalbshaut enthält : 18,00 $\pm$ 0,3 Gew% N , 13,5 Gew% Hydroxyprolin.

6% H_2O_2 : 30% H_2O_2 wurde auf 6% verdünnt . Wegen Unbeständigkeit des H_2O_2 soll diese Lösung vor Gebrauch immer frisch hergestellt werden ; 3 N H_2SO_4 ; 5% p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung : p-Dimethylaminobenzaldehyd p.a. wurde in Propanol p.a. gelöst und im Dunkeln aufbewahrt ; L-Hydroxyprolin-Standardlösung : 50mg L-Hydroxyprolin wurden in 480ml Wasser und 20ml konz. HCl gelöst . Die Stammlösung wurde dann auf 5, 10 , 15 µg /ml Hydroxyprolin mit Wasser verdünnt.

Analysengang : 1ml der Analysenlösung wurde mit 1ml 0,05 M $CuSO_4$ und 1ml 2,5N NaOH versetzt und geschüttelt . Danach wurde 1ml 6% H_2O_2 zugegeben . Die Gläser wurden geschüttelt und 10 Min. in Wasserbad bei 70°C erwärmt , wobei die Gläser gelegentlich geschüttelt werden . Nach Zugabe von 4ml 3N H_2SO_4 und 2ml 5% Dimethylaminobenzaldehyd wurden die Reagensgläser wieder geschüttelt . Anschließend wurden sie 15 Min. in Wasserbad bei 70°C erwärmt , in kaltem Wasser abgekühlt . Die Extinktion jeder Lösung wurde nach Abkühlen (10 Min.) bei 560 nm gegen eine Blindlösung gemessen . Den Hydroxyprolingehalt der Analyselösung ermittelt man aus der zur gleichen Zeit gewonnenen Eichkurve mit 5, 10, 15 µg /ml Hydroxyprolin (Abb. 5).
Der Hydroxyprolin-Mittelwert der zahlreichen untersuchten Placenta-Kollagen-Präparate liegt bei 11,00 - 12,80% , d.h. in der Größenordnung des Hydroxyprolingehaltes von Säugetier -Kollagenen (Tab. 8).

5.2. Gehalt an Kohlenhydraten , Tyrosin und Hexosamin

Im folgendes geht es um die Bestimmung kleiner Menge von Begleitkomponenten , die teilweise nur schlecht vom Kollagen abgetrennt werden können . Als Begleitkomponenten gelten allgemein Kohlenhydrate , Tyrosin und Hexosamin .
Die Ergebnisse der Bestimmung dieser Begleitkomponenten von Placenta - Kollagenen sind in der Tabelle 9 wiedergegeben .

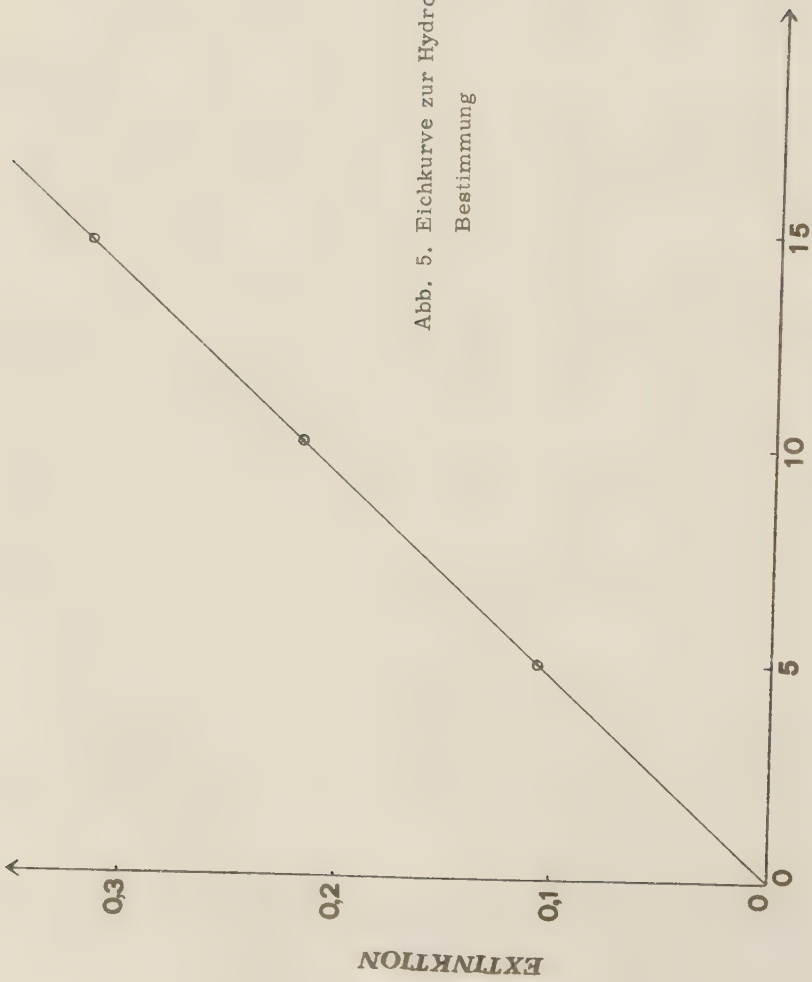


Abb. 5. Eichkurve zur Hydroxyprolin-Bestimmung

In den Placenta - Kollagenen wurde die Menge an Kohlenhydraten unter 1% festgestellt . Sie enthalten etwa die gleiche Menge Kohlenhydraten wie säurelösliches Kalbshautkollagen (46). Das pepsingelöste Kollagen enthält eine etwas geringe Menge an Kohlenhydraten als säurelösliches Kollagen : Ihre Menge wurde zu 0,4% gefunden , um etwa 0,4% niedriger als in reinen Tropokollagen (Tabelle 9).

Ein Vergleich des Tyrosingehaltes von Placenta-Kollagenen zeigt , daß die pepsingelöste Präparate etwas weniger Tyrosin als die säurelösliche Kollagene enthalten . Der Tyrosin-Gehalt läßt sich Umkristallisieren über SLS (vgl. S.147) etwas erniedrigen.

Auch die Hexosaminwerte nehmen mit zunehmender Reinigung ab. Pepsingelöste Präparate enthalten wesentlich weniger Hexosamin als säurelösliche Präparate , d.h. Hexosamin läßt sich durch Umkristallisieren über Segmente bzw. durch Pepsineinwirkung beseitigen .

Tabelle 9. Gehalt an Kohlenhydrat , Tyrosin und Hexosamin von verschieden gereinigten löslichen Placenta-Kollagenen

Präparat (Tab. 3)	Kohlenhydrat Gew%	Tyrosin Gew%	Hexosamin Gew%
Säurelösliches Kollagen			
K_1	0,95	0,47	0,30
K_1S	0,81	0,31	0,23
K_2	0,96	0,40	0,38
K_2S	0,80	0,30	0,21
K_4	0,80	0,37	0,40
Neutralsalz-lösl. Kollagen			
K_3	0,72	0,39	0,34
K_5	0,80	0,37	0,40
Pepsingel. Kollagen			
K_6	0,42	0,25	0,17
K_7	0,40	0,28	0,13
K_8S	0,35	0,25	0,09

Methodik :

i) Bestimmung von Kohlenhydraten : Die Bestimmung von Kohlenhydraten im Kollagen erfolgt nach Graßman et al (46) . Die Methode beruht auf der Osazonbildung von Kohlenhydraten , die zu einer quantitativen kolorimetrischen Bestimmungsmethode ausgearbeitet worden ist . Dabei werden neben freien Zuckern auch N-glykosidisch und isoglykosidisch gebundene Zucker erfaßt .

Reagenzien :

Acetatpuffer : 50g Na-Acetat und 50ml Eisessig werden in ausgekochten Wasser gelöst und auf 200ml aufgefüllt.

Phenylhydrazinlösung (1%) : 1g Phenylhydraziniumchlorid und 10g Natriumhydrogensulphit ($NaHSO_3$) werden in 100ml ausgekochtem Wasser gelöst .

Ausführung der Bestimmung : 10-15 mg gefriergetrocknetes Kollagenpräparat werden in einem Reagensglas mit 1ml Acetatpuffer und 1 ml Phenylhydrazinlösung versetzt und mit ausgekochtem Wasser auf 5ml aufgefüllt . Eine Blindlösung ohne Probe ist parallel anzusetzen . Dann erhitzt man die Reagensgläser 2 Std. in einem schwach siedenden Wasserbad , läßt erkalten und verdünnt auf 10ml . Die gelb gefärbten Lösungen werden bei 405 nm gegen die Blindlösung photometriert und die erhaltene Extinktion an Hand einer Standardkurve (Abb. 6) , die mit bekannten Glukosemengen aufgestellt worden war , ausgewertet .

ii) Bestimmung von Tyrosin : Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung von Tyrosin beruht auf der Reaktion von 1-Nitroso - 2-Napthol und Tyrosin , die nach Umsetzung bei 55^0C in Gegenwart von Salpetersäure zu einem gelben Derivat führt , dessen Absorption bei 450nm photometriert werden kann (161).

Reagenzien : 1-Nitroso-Napthol : 0,1% Nitrosonapthol in 95% Äthanol; Salpetersäure-Reagenz : 1:5 HNO_3 mit 0,5 mg/ml $NaNO_2$.

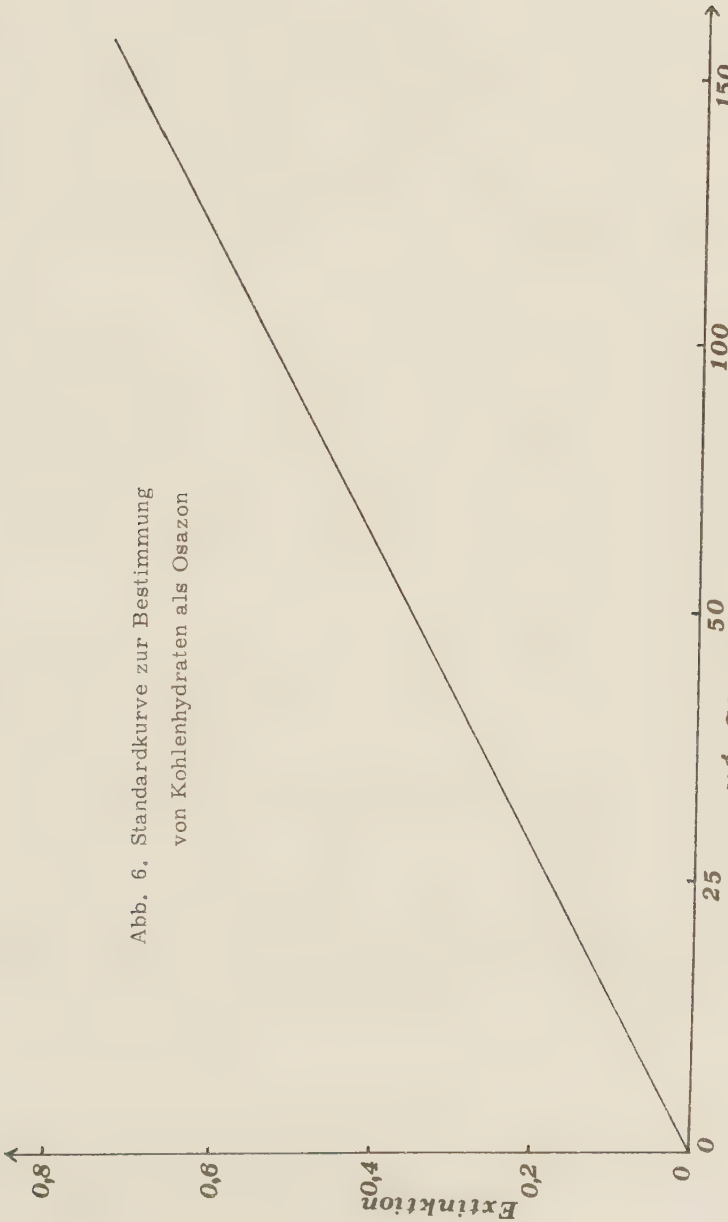


Abb. 6. Standardkurve zur Bestimmung von Kohlenhydraten als Osazon

Ausführung : Die Placenta-Kollagen-Präparate wurden zunächst hydrolysiert (S. 41) . 1ml der Analysenlösung wurde mit 1ml Nitrosonapthol und 1ml HNO_3-Reagenz versetzt und 30 Min. in einem Wasserbad bei 55^0C erwärmt . Nach Abkühlen wurden 10 ml 1,2-Dichloräthan zugegeben, die Gläser geschüttelt und zentrifugiert . Die wäßrige Lösung wurde dann getrennt und bei 450nm gegen die Blindlösung gemessen . Der Tyrosingehalt der Analysenlösung wurde an Hand einer gleichzeitig genommenen Eichkurve (Abb. 7) mit bekanntem Tyrosingehalt ermittelt (Tab. 9) .

iii) Bestimmung von Hexosamin : Hexosamin wird vorwiegend nach der Methode von Elson und Morgan (33) bestimmt . Die Methode beruht auf die Beobachtung von Müller (102) , daß Pentaacetylglukosamin nach Erwärmen im alkalischer Lösung eine rote Farbe mit dem Ehrlichen Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd in Äthanol und Salzsäure) gibt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode nach Blix (14) zur Bestimmung von Hexosamin ist eine Modifikation des Verfahrens von Elson- Morgan .

Ausführung : Die Hydrolysate (vgl. S.41) wurden zu 10ml verdünnt und mit 4N NaOH neutralisiert . 2 ml der neutralisierten Lösung wurden in Reagensgläser mit 2ml Acetylaceton (0,75ml Acetylaceton , p.a. in 25ml 1,25N Na_2CO_3 gelöst) versetzt und 45 Min. bei 96^0C erhitzt . Nach Abkühlen wurden 20ml 96% Äthanol und 2ml Ehrliches Reagenz (1,6g p-Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in 30ml konz. HCl und 3oml 96% Äthanol) zugegeben und die Reagensgläser geschüttelt . Die Extinktion wurde dann bei 530 nm gegen einen Blindansatz gemessen. Die Menge an Hexosamin in verschiedenen Kollagen-Präparate wurde an Hand einer Standardkurve (Abb. 8) ermittelt (Tab. 9).

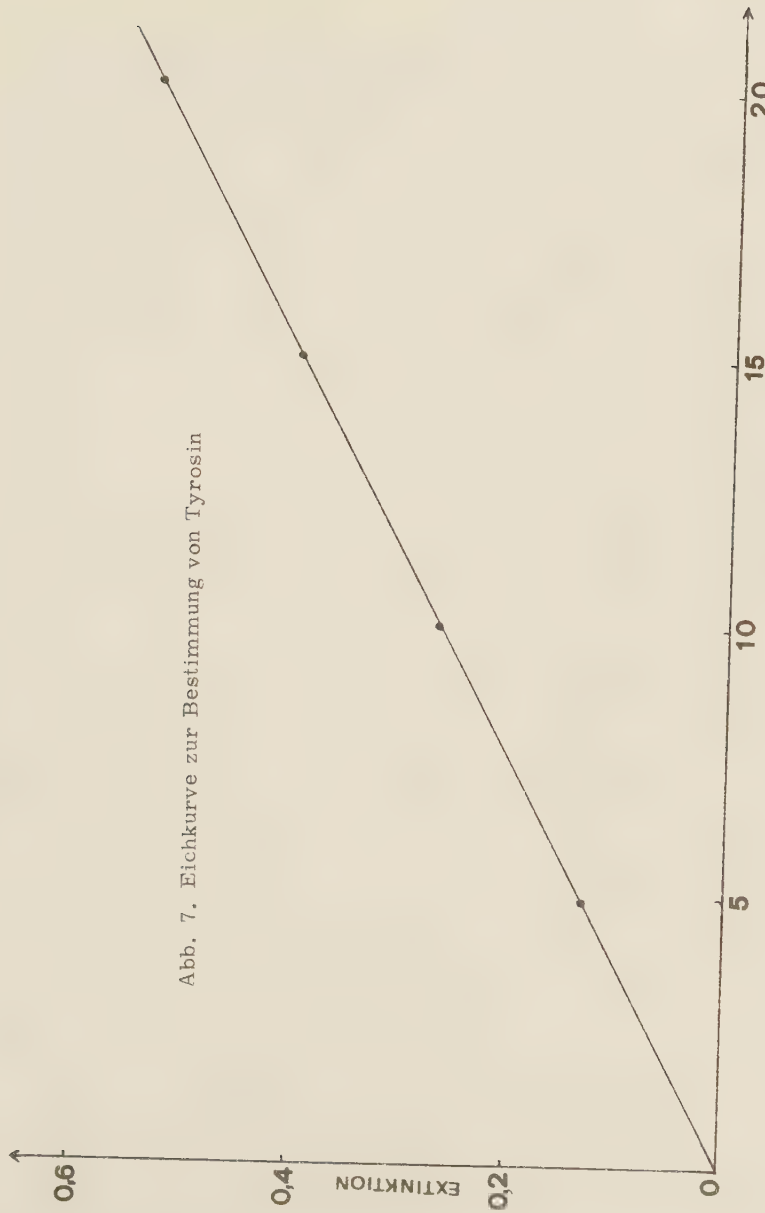


Abb. 7. Eichkurve zur Bestimmung von Tyrosin

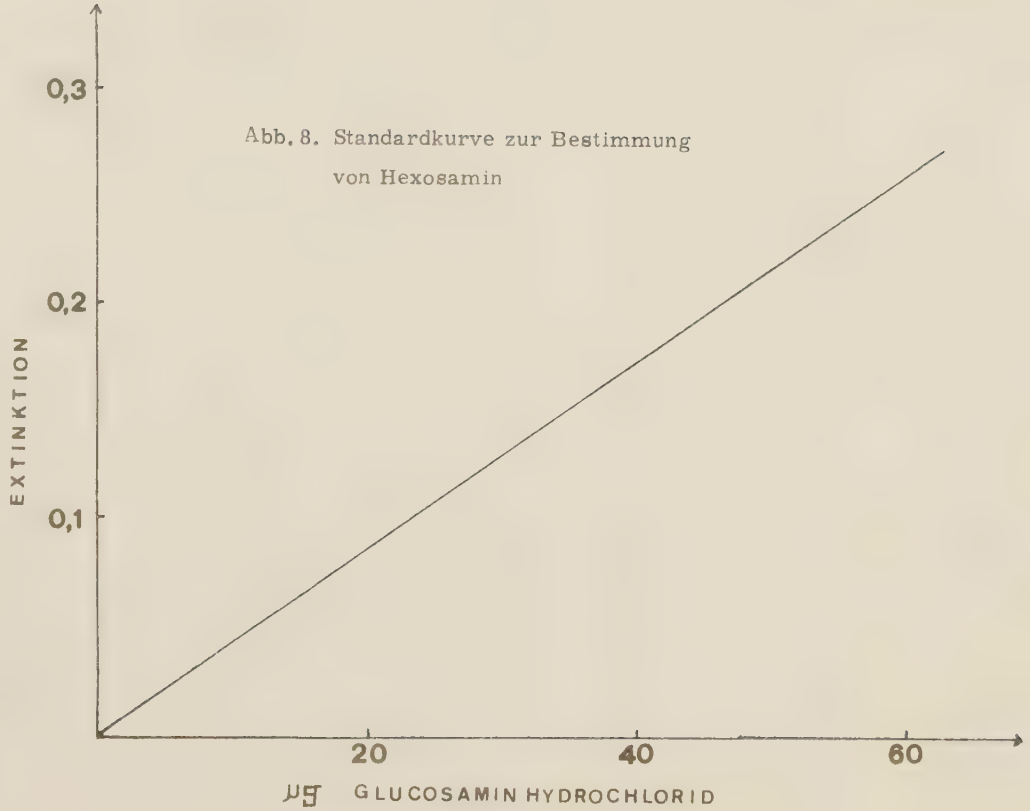


Abb. 8. Standardkurve zur Bestimmung von Hexosamin

5.3. Gesamtaminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse hat sich zur Charakterisierung und Identifizierung von Kollagen bewährt (72, 147). Die Gesamtaminosäureanalyse der Placenta-Kollagen-Präparate erfolgte mit den Aminosäureanalysatoren Multichrom B (Beckman)[x] und Durrum D-500[xx].

Die gefriergetrockneten Präparate löslicher Kollagene wurden mit 5,7N HCl (22h, 110°C) hydrolysiert und auf die Säulen der Analysatoren gegeben. Es wurde das 3-Stufenpuffersystem zur Standardproteinanalyse unter Vorschaltung der Citrat-Puffer von pH 3,25, 4,25 und 7,90 verwendet. Die Farbintensitäten der Ninhydrinreaktion mit den getrennten Aminosäuren wurden bei 440 und 590 nm automatisch registriert (Abb. 9 u. 10).

Die Auswertung ergab, daß die Aminosäurezusammensetzung der Placenta-Kollagen-Präparaten im wesentlichen mit derjenigen anderer Säugetierkollagene übereinstimmt (9). Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse von Placenta-Kollagen-Präparaten sind:

a) Hydroxyprolin, Prolin, Glycin und Alanin machen zwei drittel, der Glycingehalt allein ca. 33% der Gesamtaminosäurereste aus (Tabelle 10)
b) Die Gehalte von Tyrosin und Methionin waren niedrig
c) Hydroxyprolin und Hydroxylysin waren vorhanden, jedoch fehlten Cystein und Tryptophan
d) Pepsingelöstes Kollagen (K_6) enthält einen niedrigen Anteil an saure - und unpolaren Aminosäureresten (Tab. 11) im Vergleich zu den säurelöslichen Kollagenen (K_1 und K_2).

x) Die Aminosäureanalyse mit Beckman ist freundlicherweise durch Herrn Professor R. Riemschneider veranlaßt worden

xx) Den Herren Professoren H. Kleinkauf und J. Salnikow sei für die Bereitstellung des Analysators Durrum D-500 herzlich gedankt.

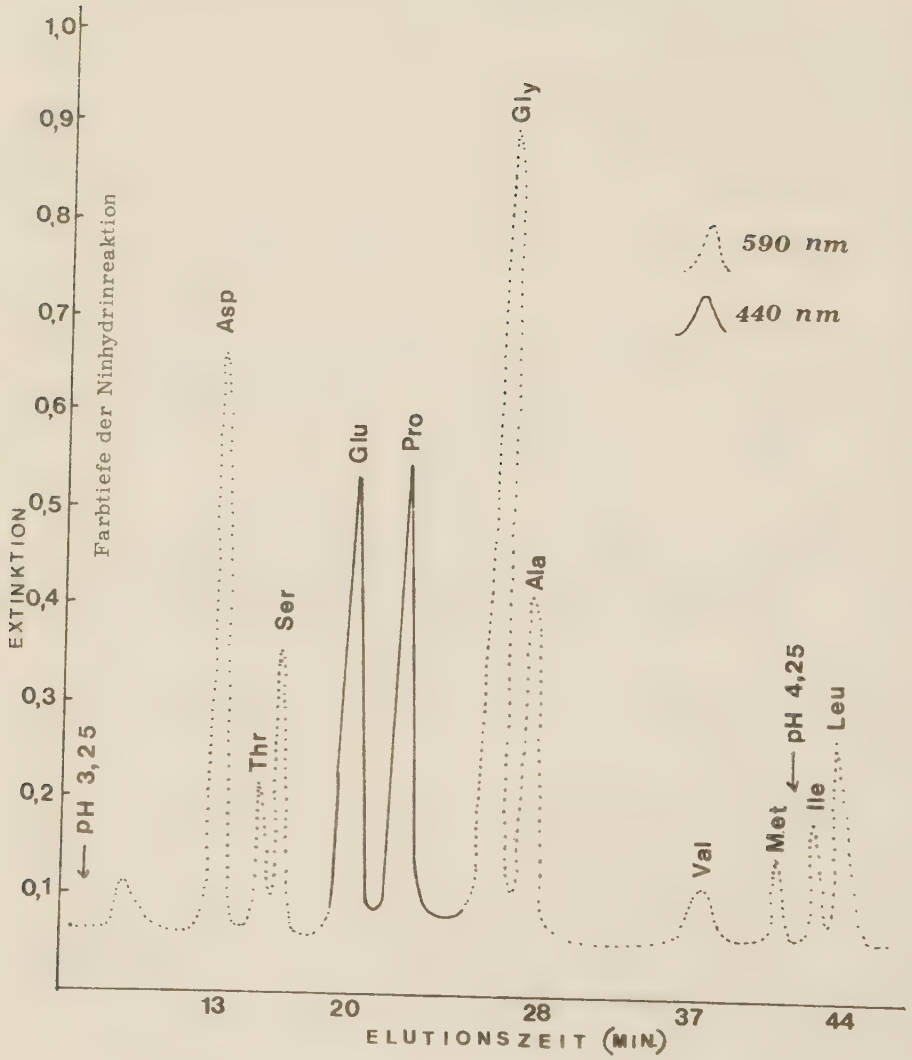
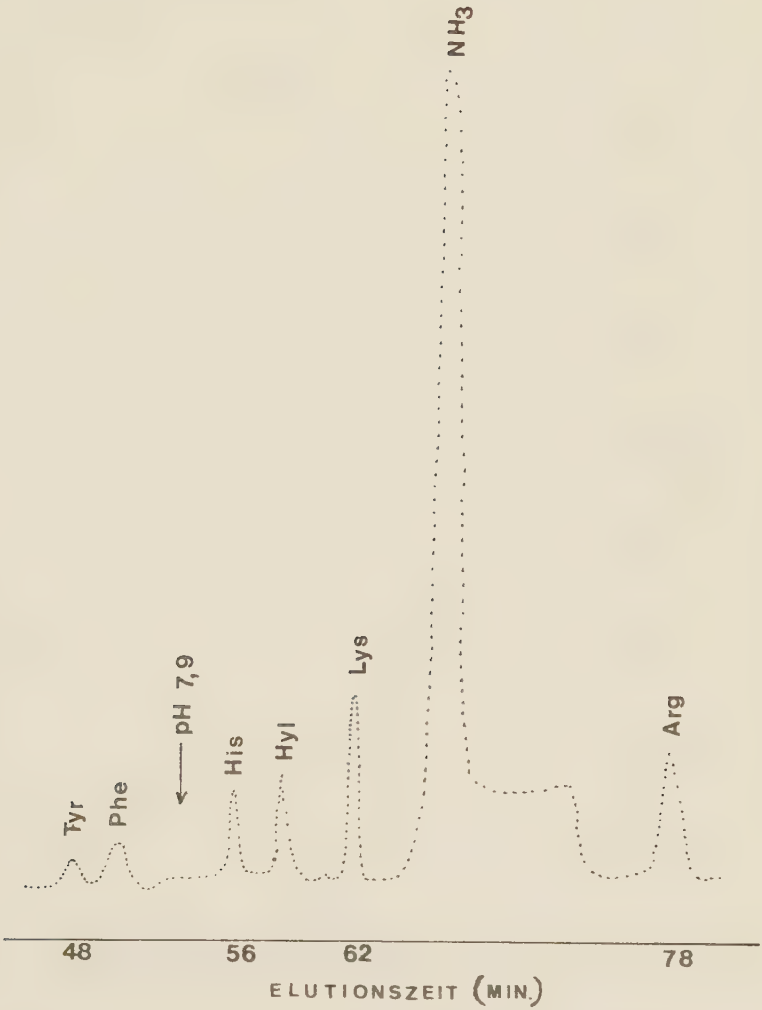


Abb. 9. Chromatogramm eines säurelöslichen Placenta-Kollagenhydolysats bei der Gesamtaminosäureanalyse mit dem Analysator Durrum D-500.



Fortsetzung des vorigen Chromatogramms (Abb. 9)

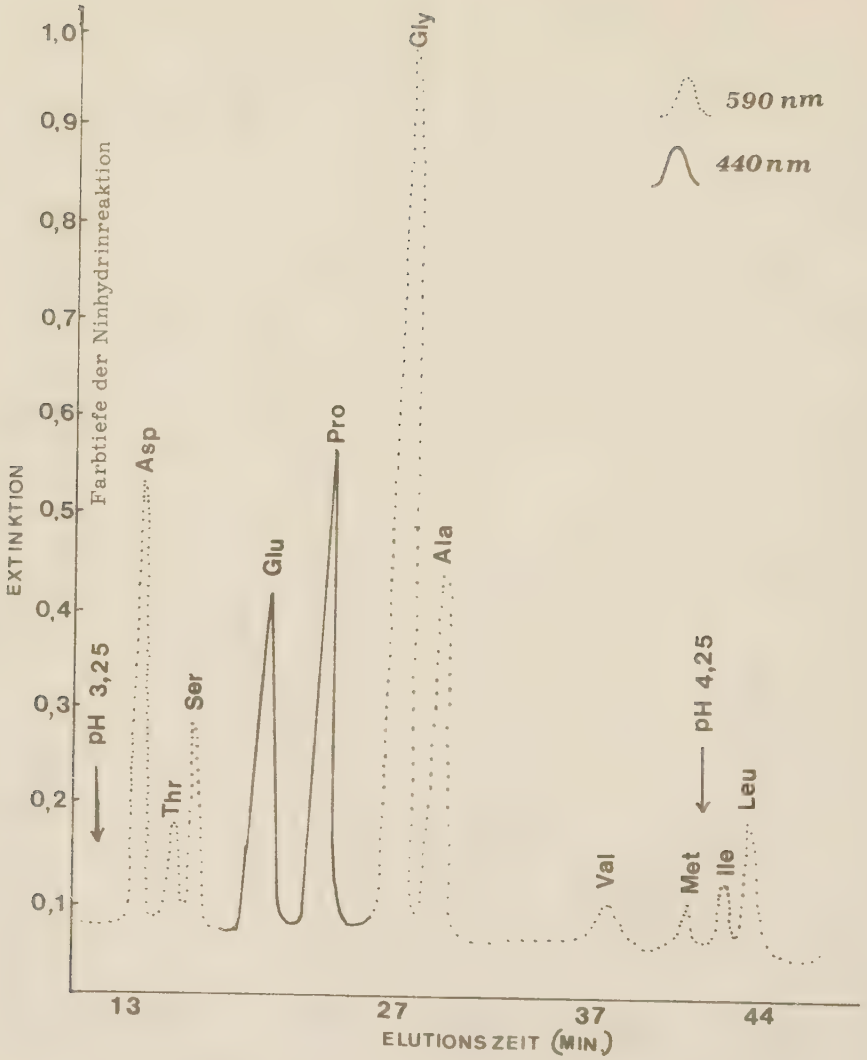
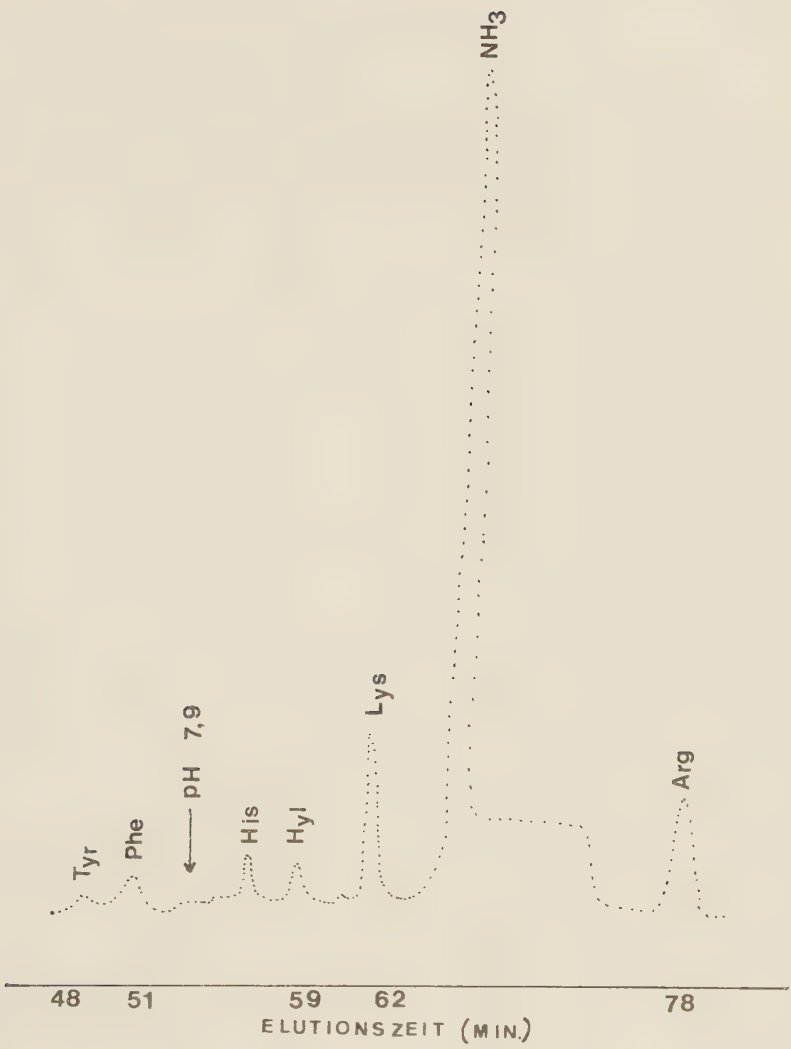


Abb. 10. Chromatogramm eines pepsingelösten Placenta-Kollagenhydrolysats bei der Gesamtaminosäureanalyse mit dem Analysator Durrum D-500 .



Fortsetzung des vorigen Chromatogramms (Abb. 10)

Tab. 10. Gesamtaminosäureanalyse einiger Placenta-Kollagen-Präparate
(Anzahl der Aminosäurereste je 1000 Aminosäurereste)

Amino-säure	Aminosäureanalysator Modell Beckman (B)	Aminosäureanalysator Modell Durrum D-500	
	Säurelösliches Kollagen K_1 (S. 137)	Säurelösliches Kollagen K_2 (S. 139)	Pepsingelöstes Kollagen K_6 (S. 142)
Hyp	86,9	88,56	103,39
Asp	45,2	45,56	46,86
Thr	17,9	18,53	16,47
Ser	34,0	33,34	35,72
Glu	68,7	71,45	60,64
Pro	131,8	119,50	117,30
Gly	333,2	330,16	339,56
Ala	113,5	120,88	112,90
Val	20,9	20,05	20,31
Met	10,4	7,98	6,11
Ile	15,1	15,37	12,29
Leu	28,8	29,93	26,98
Tyr	-	3,97	3, 34
Phe	9,3	14,05	13,14
His	3,6	6,21	4,40
Hyl	6,9	12,27	5,68
Lys	25,9	20,10	24, 85
Arg	47,9	42,09	50,06
	1000,0	1000,00	1000,00

Tab. 10a. Gesamtaminosäureanályse einiger Placenta-Kollagen - Präparate (Hydroxyprolin wurde nicht bestimmt)

Aminosäure	Säurelösliches Kollagen K_2 (Reste / 1000)	Pepsingelöstes Kollagen K_6 (Reste / 1000)
Asp	49,98	50,89
Thr	20,33	17,89
Ser	36,58	38,79
Glu	78,40	65,85
Pro	131,11	127,39
Gly	362,24	395,05
Ala	132,61	122,61
Val	22,01	22,05
Met	8,77	6,63
Ile	16,86	13,35
Leu	32,83	29,31
Tyr	4,36	3,62
Phe	15,41	14,27
His	6,81	4,78
Hyl	13,46	6,17
Lys	22,06	26,99
Arg	46,18	54,36

Tabelle 11. Aufteilung der Aminosäuren (Tab. 10) in Gruppen
(Reste / 1000)

Gruppe	Aminosäure	Säurelösliches Kollagen		Pepsingelöstes Kollagen K_6
		K_1	K_2	
Sauere Reste	Asp	45,2	45,56	46,87
	Glu	68,7	71,46	60,64
		113,90	117,02	107,51
Basische Reste	Arg	47,90	42,09	50,06
	His	3,60	6,21	4,40
	Lys	25,90	20,10	24,85
	Hyl	6,90	12,27	5,68
		84, 30	80 ,67	84,99
Unpolare Reste	Ala	113,5	120,88	112,90
	Phe	9,3	14,05	13,14
	Leu	28,8	29,93	26,98
	Ile	15,1	15,37	12,29
	Val	20,9	20,05	20,31
	Met	10,4	7,99	6,11
	Pro	131,8	119,50	117,30
		329 ,8	327,77	309,03
Hydroxy Reste	Ser	34,0	33,34	35,72
	Tyr	-	3,97	3,34
	Thr	17,9	18,53	16,47
	Hyp	86,9	88,56	103,39
	Hyl	6,9	12,27	5,68
		145,7	156,67	164,60

5.4. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Eine der besten Möglichkeiten zur Charakterisierung von Kollagen ist die Anwendung der Transmissionselektronenmikroskopie . Elektronenmikroskopisch kann man an Kollagenfibrillen nach Kontrastierung mit Phosphowolframsäure (PWS) , Chrom (III)-Komplexen oder Uranylacetat eine asymmetrische , hochunterteilte Querstreifung erkennen . Sie beruht auf regelmäßig wiederkehrenden Anhäufungen von polaren Aminosäuren ; sie stellen die dunkeln Querstreifen , die bands, die ungeordneten Bereiche der Periode dar , während die hellen Querstreifen , die interbands , geordnet sind und sich mehr aus apolaren Aminosäuren zusammensetzen (8) .

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchungen werden die Proben in Wasser suspendiert , 20 Min. mit Ultraschall behandelt , auf Blenden aufgetragen , die Fibrillen in 1% Phosphorwolframsäure angefärbt und schließlich mit 1% Uranylacetat auf dem Objektträger nachkontrastiert.

Zur Durchführung der Untersuchung wird das entsprechend vorbereitete Präparat oder ein Oberflächenabdruck des Präparats (Kohlenstoffilm) von einem Elektronenstrahl durchdrungen . Das entstehende Leuchtsschirmbild wird mit einem Mikroskop beobachtet . Das Auflösungsvermögen beträgt einige Å . In der vorliegenden Arbeit wurde das Elektronenmikroskop EM Siemens 1139 80 KV angewandt [x] .

Sowohl bei der Behandlung mit Phosphorwolframsäure zur Kennzeichnung der basischen Seitenketten als auch mit Uranylacetat zur Anheftung an die sauren Gruppen zeigt sich eine charakteristische Querstreifung von 670 Å (Abb. 11 u. 12 [xx]) . Dies bedeutet , daß viele Kollagenmoleküle

x) Herrn Professor A. Wilgalis , Fr. R. Neumann und Fr. I. Henschke sei für die Herstellung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen herzlich gedankt .

xx) Abb. 11 u. 12 : Kollagenfibrillen aus Achillessehne

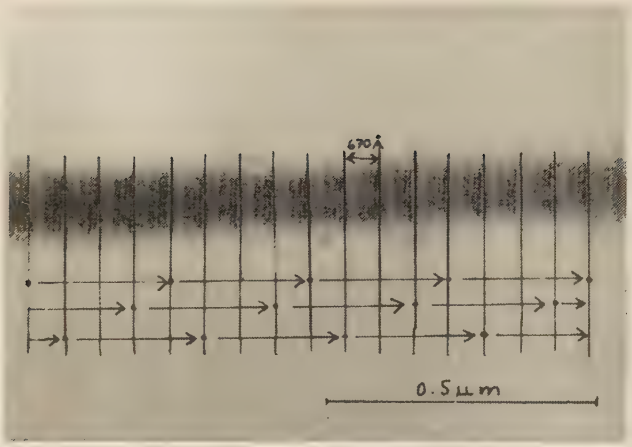


Abb. 11. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kollagenfibrille aus Achillessehne , Elektronenopt. Vergrößerung : 20000 ; Ein Tropo-Kollagenmolekül läuft (symbolisiert durch einen Pfeil) durch vier der 670Å breiten Bänder .

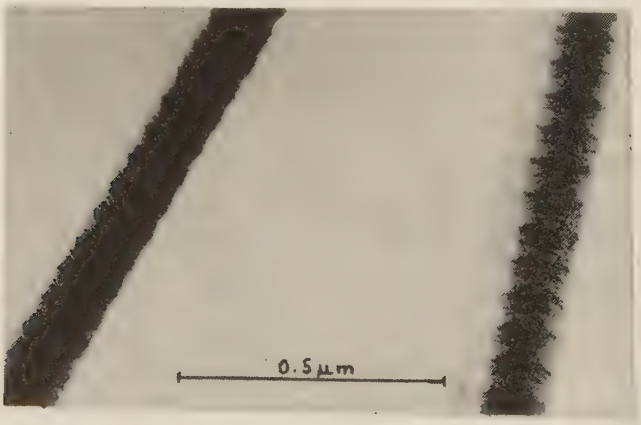


Abb. 12. Unlösliche native Kollagebfibrille aus Achillessehne , Elektronenoptische Vergrößerung : 40000.

mit sehr ähnlichem Bauplan parallel zueinander liegen und daß auch die Amino - und Carboxyl- Enden der einzelnen Tripelhelices in die gleiche Richtung weisen .

Ergebnisse :
In den TEM- Aufnahmen (Abb. 13,14 ,15) von nativen Kollagenfasern aus Rinderplacenten ist die charakteristische Querstreifung von 640 Å zu erkennen . Verschieden vorbehandelte und durch verschiedene Extraktionsmittel gewonnene Placenta-Kollagen-Präparate zeigen das gleiche Querstreifungsmuster von ca. 640 Å (Abb. 13 , 14). In Übereinstimmung mit der einschlägigen Literatur läßt sich zeigen , daß die Placenta-Kollagene die charakteristische Querstreifungsperiode von Tropokollagenmolekülen besitzen .

In den elektronenmikroskopischen Bildern (Abb. 13,14 ,15) bestehen die dunkeln Querstreifen aus Anhäufungen polarer Aminosäuren , die aufgrund ihrer sperrigen Seitenketten weniger geordnete Bereiche der Periode bilden , und die hellen Querstreifen vorwiegend aus apolaren Aminosäuren , die als kristallin geordnete Bereiche erscheinen . In den dunkeln Teilen liegt eine Anhäufung basischer (Arginin , Lysin) und sauerer Aminosäuren (Asparagin , Glutaminsäure) vor , und die hellen Teile der elektronenmikroskopischen Bilder sind hauptsachlich aus Tripeptidsequenzen der allgemeinen Formel $(-G-P-X)_n$ aufgebaut (76).

Kühn et al (71) fanden in Kalbshautkollagen -Präparaten eine Querstreifung von 700 Å . Nach Hodge u. Schmitt (62) , Kühn , Grassmann und Hoffman (70) ist dieses Querstreifungsmuster auf die Primärstruktur der Tropokollagenmoleküle (Kalbshaut) zurückzuführen . Bei der Bildung von Fibrillen des nativen Typs treten die Tropokollagenmoleküle so zusammen , daß sich ihre negativen und positiven Ladungen gegeseitig absättigen . Auf Grund der Ladungsmuster gelingt es nur , wenn sie um ein Viertel ihrer Länge gegenseitig verschieben (76).

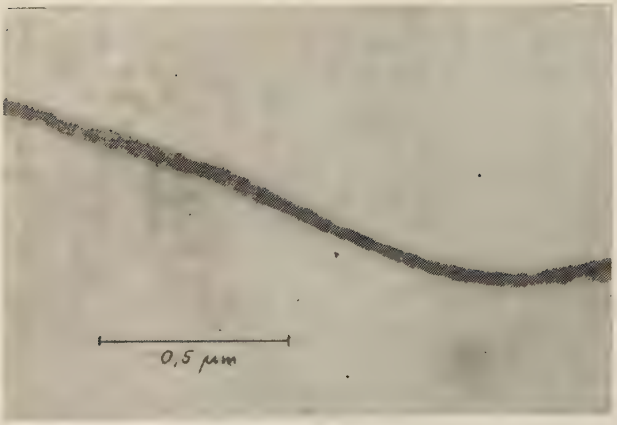


Abb. 13. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines dialysierten, fibrillären Citrat-Puffer löslichen Kollagens aus Rindерplacenta. Querstreifung : 640 Å , Elektronenopt. Vergrößerung: 14000

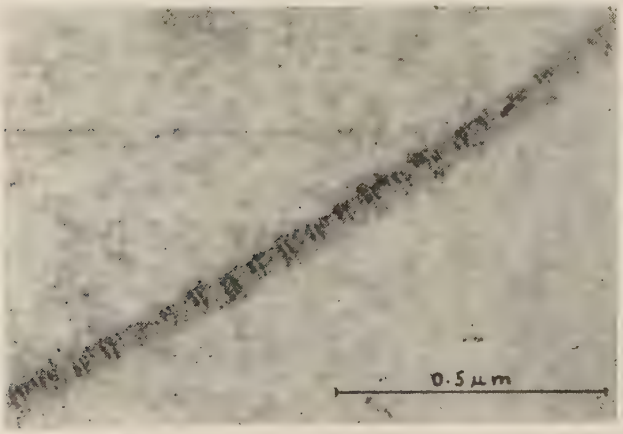


Abb. 14. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines dialysierten , fibrillären , essigsäurelöslichen Placenta-Kollagens . Querstreifung : 640 Å . Elektronenopt. Vergrößerung : 20000

Abb. 15. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines dialysierten fibrillären pepsingelösten Kollagens aus Rinderplacenta. Elektronenoptische Vergrößerung : 20000

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen der Aminosäureanordnung längs der Placenta-Kollagenmoleküle eignen sich nur die "Segment-Long-Spacing" (SLS) Kollagene . In ihnen liegen die Tropokollagen-Moleküle mit den Enden abschneinend parallel nebeneinander , so daß sich in ihren Querstreifungsmustern die Verteilung der Aminosäuren direkt wiederspiegelt (Abb. 16 ,17) . Ungeeignet sind dagen die Fibrillen des nativen Typs (Abb. 13, 14 , 15) da ihr Querstreifungsmuster durch Überlagerung von vier verschiedenen Abschnitten des Tropokollagenmoleküls zustande kommt .

Herstellung der Segment-Long-Spacing Placenta-Kollagen-Präparate :

0,05g gefriergetrocknete Kollagen wurde in 50ml 0,05%ige Essigsäure, pH 3,2 , gelöst und zentrifugiert . Die Lösung wurde dann gegen 0,04% $ATPNa_2$-Lösung (pH 3,2) 3 Tage lang dialysiert . Der Niederschlag wurde mehrere Male mit frischer $ATPNa_2$-Lösung gewaschen und danach gefriergetrocknet .

Durch Zugabe von $ATPNa_2$ zu gelösten Kollagen -Einheiten aggregieren sie zu Segment -Long-Spacing Kollagenformen. Die Long-Spacing-Segmente bilden sich nur , wenn die Tropokollagenmoleküle keine negative Ladungen besitzen , d.h. bei saurem pH , wenn die Carboxylgruppen nicht mehr dissiziert sind . Im TEM läßt sich zeigen , daß hier Einzelfasern parallel liegen , es wird eine deutliche Identitätsperiode von 2400 -2700 Å in der Längsrichtung des Tropokollagens sichtbar (Abb. 16,17,18).

Rice et al (137) fanden in SLS vom Kalbshautkollagen eine Identitätsperiode von 2400 Å , die mit denen Placenta-Kollagen-Präparaten gefundenen Werten in der Größenordnung übereinstimmt . Nach Angaben von Hodge u. Schmitt (62) beträgt die Querstreifungsperiode von Kalbshaut-SLS ca. 2800 Å .
Abb. 18b zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von SLS-Kristalliten aus pepsingelöstem Placenta-Kollagen und Abb. 18a von särelöslichem Kollagen . Das Querstreifungsmuster von Abb. 18b ist 2350 Å ;

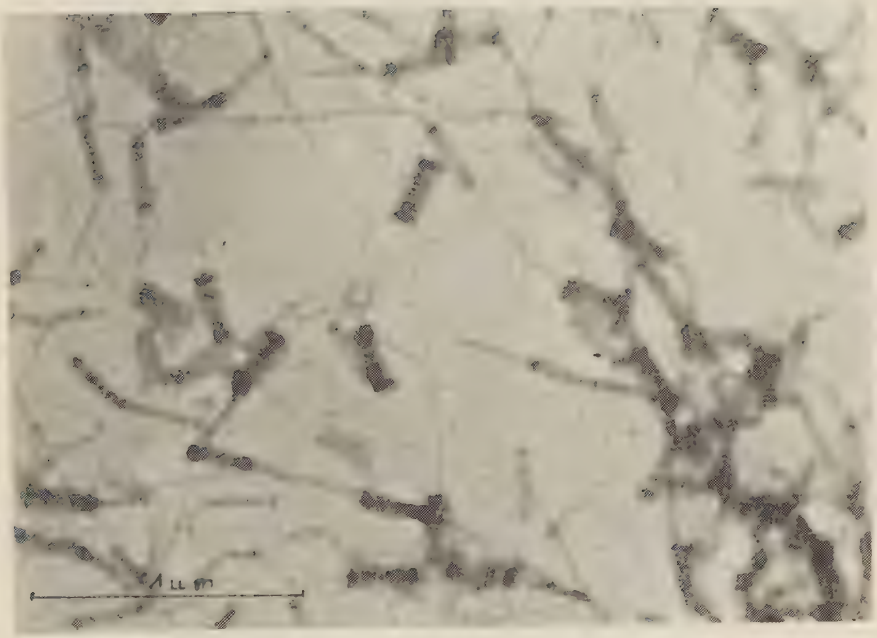


Abb. 16. Long-Spacing-Segment (SLS) mit symmetrischem Querstreifungsmuster aus säurelöslichem Placenta-Kollagen (Kollagen-Präparat K_1S).
Elektronenoptische Vergrößerung : 20000

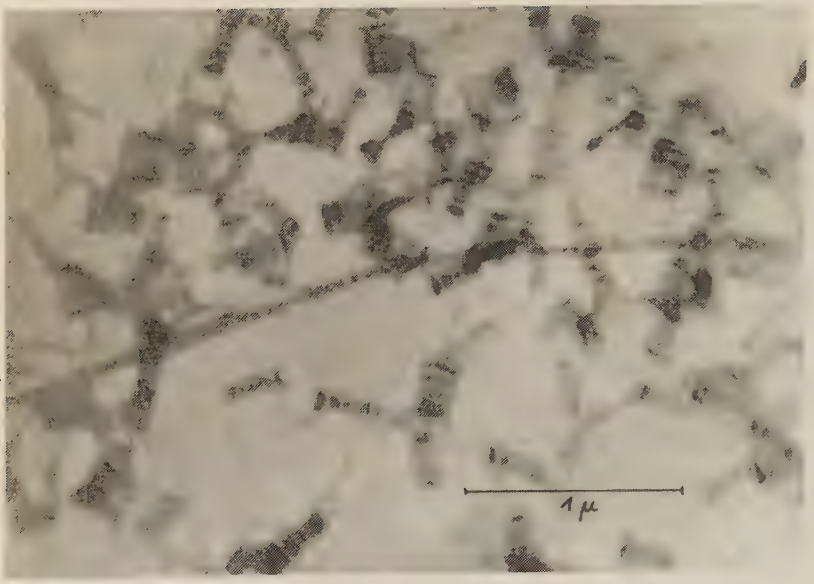


Abb. 17. Long-Spacing-Segment (SLS) mit symmetrischem Querstreifungsmuster aus pepsingelöstem Kollagen (Kollagen-Präparat K_6S).
Elektronenoptische Vergrößerung : 20000

Abb. 18. Vergleich der Querstreifungsperioden von säurelöslichen -

und pepsingelösten Kollagenen. a) SLS aus säurelöslichem Kollagen(K_{ac}), Querstreifungsperiode 2500 Å , Elektronenopt. Vergrößerung 4000

b) SLS aus pepsingelöstem Kollagen (K_{pe}) , Querstreifungsperiode : 2350 Å , Elektronenoptische Vergrößerung : 40000

dagegen zeigt Abb. 18a eine Querstreifung von 2500 Å. Durch Einwirkung von Pepsin ist das Tropokollagenmolekül etwas kürzer geworden. Diese Verkürzung beträgt etwa 6% . Die Verkürzung des Kollagens durch die Einwirkung von Pepsin ist auf die Abspaltung von Schwanzpeptiden zurückzuführen (72) . Da die Kollagenmoleküle unterhalb des Denaturierungspunktes gegen proteolytische Enzyme beständig sind , gelingt eine Abtrennung der Begleitkomponenten durch Pepsinbehandlung . Die abgespalteten Peptide dürften nicht den Tripelhelices des Kollagenmoleküls angehören , sondern außen angeordnet sein (53) . Nach Angaben von Nishihara (119) soll pepsingelöstes Kollagen von Kalbshaut aus etwas kürzeren Teilchen bestehen als Tropokollagen , diese Verkürzung beträgt etwa 10% . Nach Rubin et al (147) machen die sogenannten Teleopeptide , die durch Pepsinbehandlung abgespalten werden können , etwa 2 bis 3% des Kollagens aus .

Mit den TEM-Aufnahmen von Abb. 19 u. 20 kann man die Vorgänge zur Bildung von SLS-Molekülen von nativen Fibrillen zeigen , was in der Literatur noch nicht berichtet wurde . Durch vorzeitige Einstellung der Dialyse zur Herstellung der SLS-Präparaten wurde dieses Zwischenstadium (Übergang der nativen Fibrillen zu Segmenten) festgehalten und im Elektronenmikroskop dargestellt . Es ist deutlich zu erkennen , wie sich die Fibrillen des nativen Typs zur Bildung von Segmenten zusammenlagern. Die Bildung der Segmente wird von den Versuchsbedingungen bei der Ausfällung beeinflußt. Eine besondere Rolle spielen der pH-Wert der Lösung sowie die Schnelligkeit der Segmentbildung nach $ATPNa_2$-Zugabe. Um die Versuchsbedingungen möglichst zu standardisieren , wurden 0,05%-ige Kollagenlösungen längere Zeit (3 bis 4 Tagen) gegen 0,4% $ATPNa_2$-Lösung dialysiert . Unter diesen Bedingungen bilden sich die Segmente langsamer als direkte Zugabe von $ATPNa_2$ (Abb. 22) , und es entstehen bedeutend besser quergestreifte und breitere Segmente (Abb. 21) .

Abb. 19 Bildung von SI S Kollagen aus Kollagenfibrillen
Elektronenoptische Vergrößerung : 10000

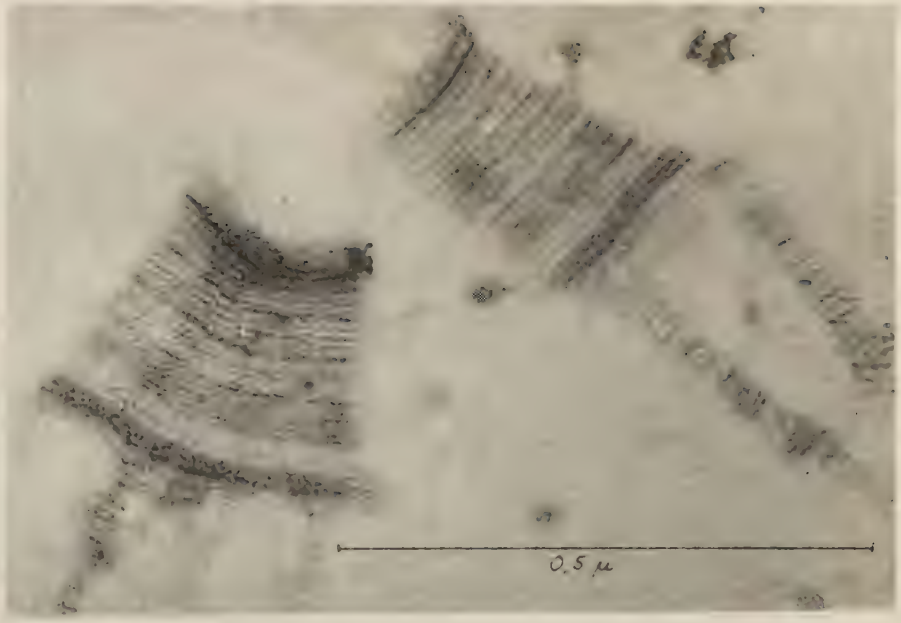


Abb. 20. Bildung von SLS-Kristallitan von Fibrillen des nativen Typs.
Querstreifung - 2340 . Elektronenop. Vergrößerung : 40000

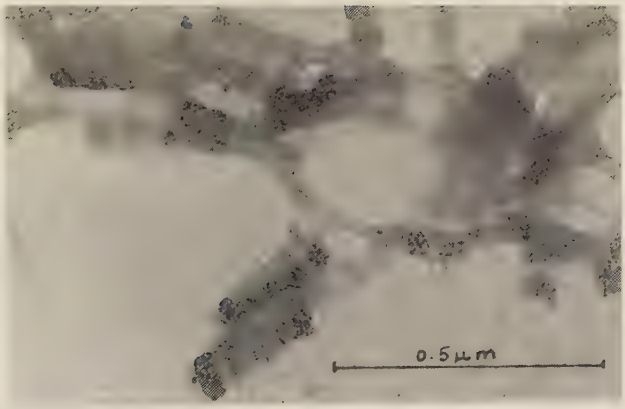


Abb. 21. Segment-Long-Spacing Kollagen , entstanden durch Dialyse von 0,1%igen Kollagenlösung in 0,05% CH_3COOH , pH 3,2 , gegen 0,4% $ATPNa_2$-Lösung , gleicher pH-wert.
Elektronenoptische Vergrößerung : 40000

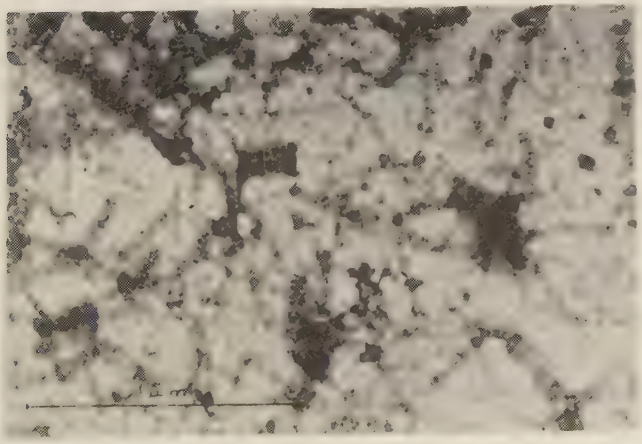


Abb. 22. Segment-Long-Spacing Kollagen , entstanden durch Zugabe von 0,4g $ATPNa_2$ in 100ml 0,05%ige Kollagenlösung in CH_3COOH. Elektronen. opt. Vergrößerung : 40000

5.5. Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Die Rasterelektronenmikroskopie hat sich nach einer stürmischen Entwicklung als unentbehrliches Hilfsmittel für die mikromorphologische Untersuchung von Oberflächen erwiesen .

Zur Erforschung der löslichen Kollagene aus der Haut von Kalbsembryos ist das Rasterelektronenmikroskop (SEM) in jüngster Zeit herangezogen worden (141) .

Beim SEM wird die Oberfläche eines elektrisch leitfähigen (metallbedampften) , dreidimensionalen Präparats mit einer feinen Elektronensonde zeilenförmig abgetastet . Die im Präparat ausgelösten Sekundärelektronen (und der rückgestreuten Elektronen) werden in einem Detektor in Abhängigkeit von der Lage der Sonde registriert und im Fernsehabtastrhythmus auf einem Fernsehmonitor wiedergegeben . Bei nichtleitenden Oberflächen - also insbesondere bei biologischen Objekten - wird noch eine dünne leitende Schicht aufgedampft , um elektrostatische Einflüsse auf die abtastenden Elektronen zu vermeiden. Die Auflösung des Oberflächenrastermikroskops kann nicht sehr groß sein , da sich der Elektronenstrahl im Präparat durch Vielfachstruung verbreitet (ca. 5 - 10nm) . Andererseits sind aber derartige Oberflächenbilder außerordentlich brillant und kontrstreich.

Zur Charakterisierung sowie zur Feststellung des Bindegrads und des Oberflächenreliefs des löslichen Placenta-Kollagens wurde in dieser Arbeit das Rasterelektronenmikroskop Stereoscan Mark IIa verwendet.+) Zur Betrachtung im SEM wurde eine kleine Menge gefriergetrockneten Kollagen-Präparat mit Gold bedampft .
Bei der Untersuchung von verschiedenen behandelten Placenta-Kollagenen im SEM wurden verschiedene Oberflächenreliefs sowie Zusammenlagerungen der Kollagenfibrillen beobachtet (Abb. 23, 24 25 u. 26).

+) Herrn Dr. W. H. Chik sei für die SEM-Aufnahmen herzlich gedankt

Die erhaltenen Ergebnisse sind im folgenden zusammengefaßt :

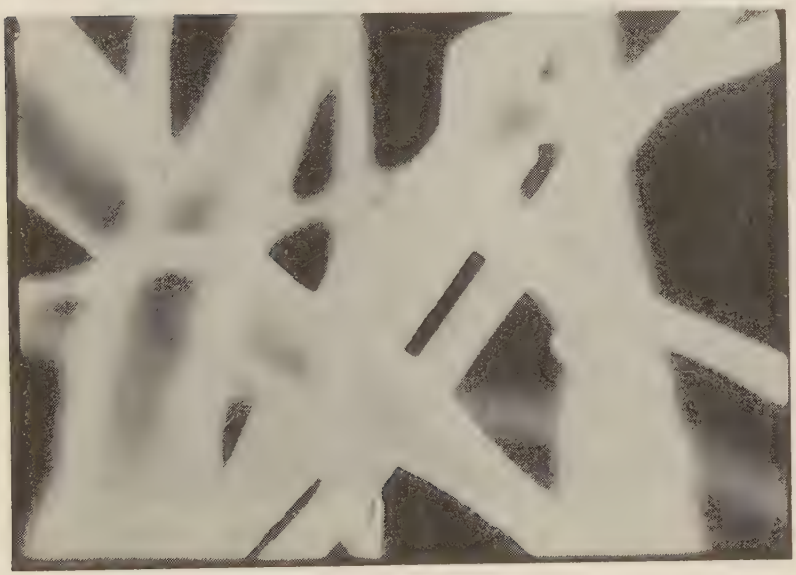


Abb. 23. Die Dicke einer in dieser Abbildung betrachteten Fibrille des säurelöslichen Kollagens (Kollagen-Präparat K_1) beträgt 4,5 µm . Im SEM erkennt man ein Netzwerk feiner Kollagenfibrillen. Vergrößerung : 2000

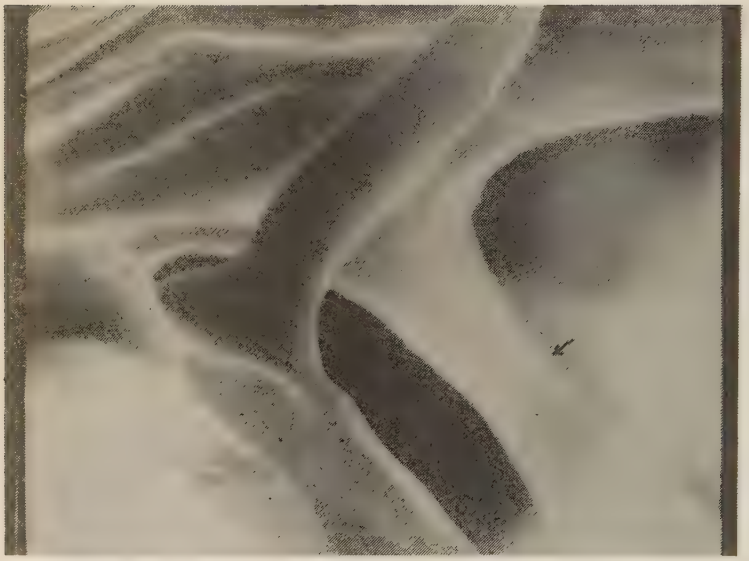


Abb. 24. Rasterelektronenmikrograph eines löslichen Placenta-Kollagen-Präparates (Präparat K_3) , das mit $ATPNa_2$ behandelt wurde . Die Dicke einer betrachteten Fibrille beträgt 3,4 µm . Zusammenlagerung mehrerer solcher Kollagenfibrillen führt zur Bildung einer Schicht . Vergrößerung : 5000

Abb. 25. Rasterelektronenmikrograph eines Gelatinpräparates von Placenta-Kollagen. Das Präparat (K_2) wurde 30 Min. bei 45 ^{0}C in 0,05M $CaCl_2$-Lösung erwärmt und zur Gelatine umgewandelt . Nach Zentrifugieren wurde die Lösung gegen 0,01M Essigsäure dialysiert und gefriergetrocknet . Im SEM zeigt die Gelatine keine Fibrillen , sondern eine glattere Oberfläche . Diese Änderung ist auf die Hitzedenaturierung des löslichen Kollagens zurückzuführen.
Vergrößerung : 1000

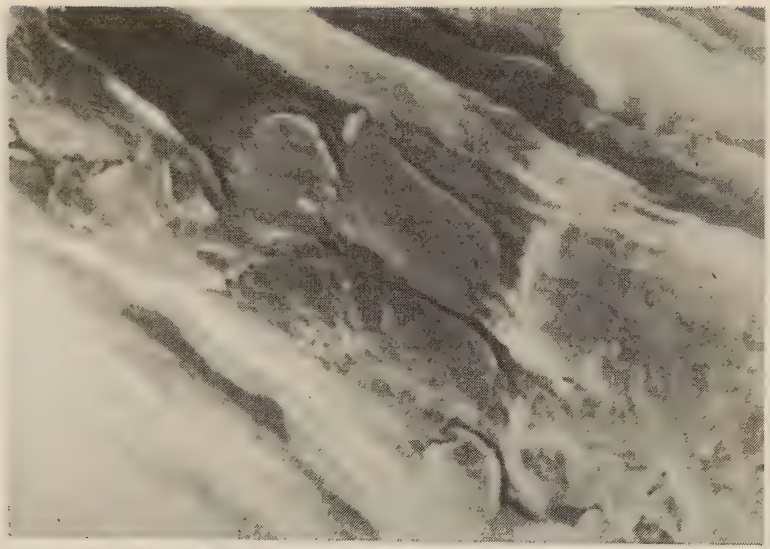


Abb. 26. Das gefriergetrocknete säurelösliche Kollagen-Präparat (K_4) wurde mit Chondroitinsulfat behandelt . Dabei bilden sich Long-Spacing-Fibrillen (FLS) . Nach 1 tägigen Dialyse wurde das Kollagen gefriergetrocknet und im SEM betrachtet . Hier zeigt das Präparat eine rauhe Oberfläche. Das Chondroitinsulfat wurde nicht vollständig entfernt. Mehrere Fibrillen haben sich zur Bildung der Schichten zusammengelagert . Vergrößerung : 5500

5.6. Infrarotspektroskopie

In dem vorliegendem Abschnitt wird die Anwendung der IR-Spektroskopie zur Untersuchung der strukturellen Eigenschaften verschiedener Kollagen-Präparate aus Rinderplacenten beschrieben . Als Meßgerät diente das Infra-Rot-Spektroskop Modell III G (E. Leitz, Wetzlar).

1g KBr. (p.a. Spektro) wurde mit 4-5mg Kollagen sorgfältig in einem Achatmörser gerieben und vermischt . Danach wurde die Mischung auf den Preßstempel gleichmäßig aufgebracht und mit der Hand mittels eines Stempels vorsichtig angepreßt . Dann wurde die Mischung in einer hydraulischen Presse bei einem Preßdruck von 250 kP/cm^2 zu einem durchsichtigen Preßling gepreßt . Dieser wurde sofort unter Feuchtigkeitsausschluß im IR-Gerät vermessen . Das IR-Spektrum eines Placenta-Kollagen-Präparates (Präparat Nr. 2) zeigte folgende Banden (Tabelle 12) .

Die IR - Spektren von verschiedenen löslichen Placenta-Kollagen-Präparate zeigten etwa gleiche Intensitäten der Amid-Banden, jedoch mit kleinen Unterschieden in der Feinstruktur der Amid I - und II-Banden (Abb. 27 u. 28). Die in Abb. 27 u 28 wiedergegebene IR-Spektren sind typisch für säurelösliche bzw. pepsingelöste Kollagen-Präparate . Zahlreiche IR-Spektren von verschieden Kollagenen wurden aufgenommen und die folgende Ergebnisse ergaben sich für das säurelösliche Kollagen K_2 (Abb. 27) .

i) Amid A-Bande : Die Amid A-Bande (verbunden mit der NH-Sreckschwingung) des Placenta-Kollagens liegt bei 3250 cm^{-1}. Eine freie NH-Streckschwingung findet im Bereich 34oo - 3440 cm^{-1} statt ; aber wenn sich die NH-Gruppe eines Peptids in der Wasserstoffbindung beteiligt , so wird die Lage zu einer niedrigen Frequenz verschoben (normalerweise nahe 3300 cm^{-1}) . Je stärker die Wasserstoffbindung ist , desto niedriger ist die Lage dieser Bande (29) . Demnach sollte Kollagen schächere Wasserstoffbindungen als andere Proteine besitzen.

Tabelle 12 . Banden im IR-Spektrum eines aus Rinderplacenten hergestellten Kollagen-Präparates (Abb. 27)

Frequenz cm^{-1}	Zuordnung	Bemerkungen
3250	sehr stark	NH- Streckschwingung , Amid A-Bande
3030	schwach	NH-Streckschwingung , Amid B-Bande
2950	schwach	Asymmetrische CH-Streck-schwingung (CH_3)
2900	stark	Asymmetrische CH-Streck-schwingung (CH_2)
2870	sehr schwach	Symmetrische CH-Streck-schwingung (CH_3)
2850	sehr schwach	Symmetrische CH-Streck-schwingung (CH_2)
1630	sehr stark	Amid I-Bande des Sek. Amids C=O Streckschwingung der Helixstruktur
1525	strak	Bande Amid II der Helix-Struktur , NH-Deformations- & CN-Streckschwingung
1425	schwach	CH_2-oder CH_3 Deformations-schwingung
1380	schwach	Symmetrische CH_3-Deforma-tionsschwingung
1225	stark	Amid III-Bande der Helix-struktur
1075	schwach	C-O Streckschwingung

ii) Amid I-Bande : Die Amid I-Bande von Kollagen liegt bei 1630 cm^{-1}. Bradbury et al (17) berichten , daß die Amid I-Bande verschiedene Komponenten enthält ; die stärkste hat die Frequenz von 1600 cm^{-1}. Das bedeutet die Existenz einer nichtäquivalenten C=O Bindung . Verschidene IR-Untersuchungen an Placenta-Kollagen-Präparaten haben diese Befunde bestätigt . Die Placenta-Kollagene besitzen eine asymmetrische Amid I-Bande bei 1630 cm^{-1}.

iii) Amid II-Bande : Die Amid II-Bande der Kollagene liegt im Bereich von 1530 -1540 cm^{-1} , wohingegen andere Amid II-Banden bei tieferen Frequenzen (1525 cm^{-1}) liegen . Diese Banden sind in Bezug auf ihre Struktur schwer zu analysieren , da es in diesem Bereich auch NH-Deformations - und CN-Streckschwingungen liegen.

Das IR-Spektrum vom pepsingelösten Kollagen (K_6) zeigt außer den üblichen Banden des säurelöslichen Präparates (K_2) zwei andere Banden : Die Bande der OH- Deformationsschwingung liegt bei 925 cm^{-1} und die Bande der C-S Streckschwingung liegt bei 840 cm^{-1} (Abb. 27 und 28) .

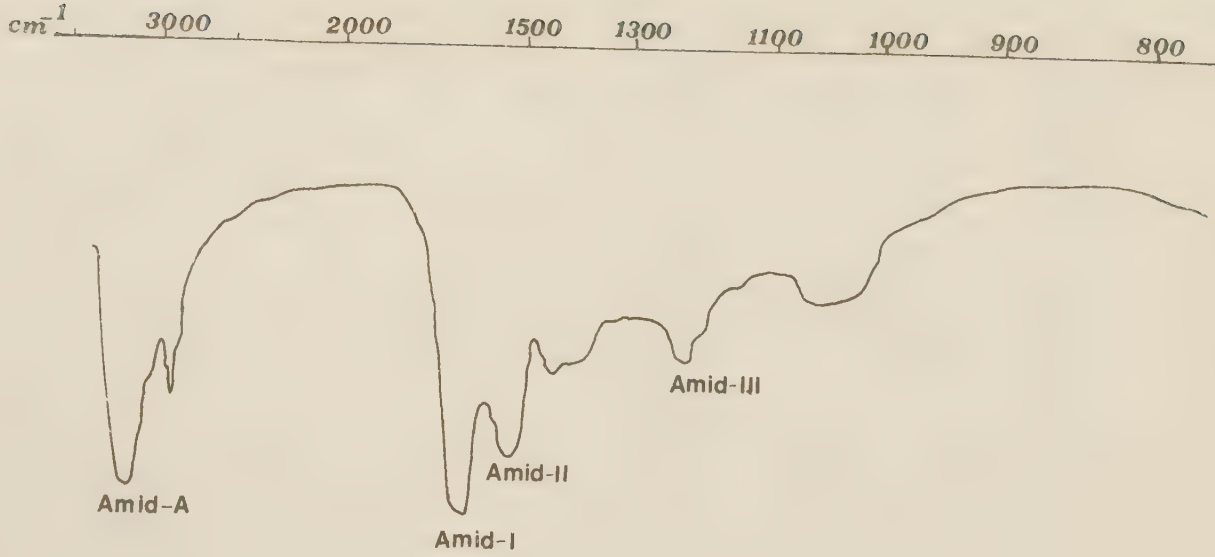


Abb. 27. Infrarot-Transmissionsspektrum eines säurelöslichen Placenta-Kollagens (Kollagen-Präparat K_2)

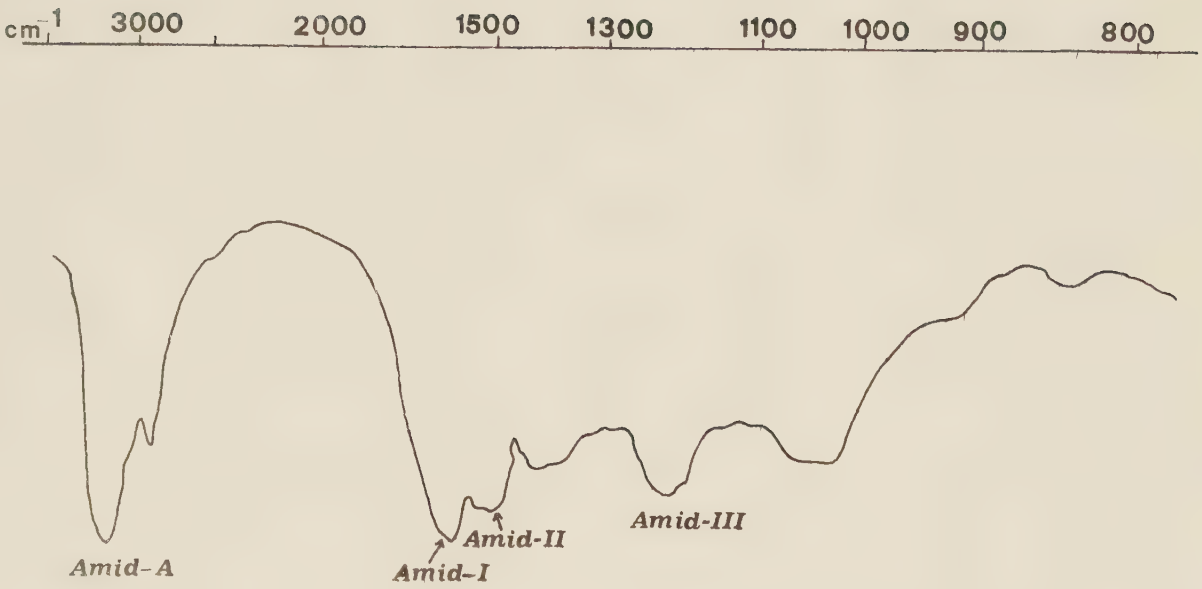


Abb. 28. Infrarot-Transmissionsspektrum eines pepsingelösten Placenta-Kollagens (Kollagen - Präparat K_6)

5.7. Molekulargewichtsbestimmung

Proteine , die mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) behandelt wurden , zeigen in der SDS-Gelelektrophorese eine Beweglichkeit , die logarithmisch mit dem Molekulargewicht des Proteins korreliert ist (165) . Aufgrund dieses logarithmischen Zusammenhanges zwischen Molekulargewicht und Mobilität , diese Methode geeignet sein , das Molekulargewicht von Kollagen-Proteinen zu bestimmen (166) .

Durchführung :

a) Herstellung der Reagenzien :

Acrylamidlösung : 22,2 g Acrylamid
+ 0,6g Methylenbisacrylamid
+ H_2O ad 100 ml

Gelpuffer : 7,8 g $NaH_2PO_4 . H_2O$
+ 51,8g $Na_2HPO_4 . 12H_2O$
+ 2g SDS
+ H_2O ad 100 ml

N,N,N',N'- Tetramethyl-äthlendiamin : 6% in Wasser (TEMED)

Bromphenolblaulösung : 0,05 % in H_2O

Probenpuffer : 1,8g $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ + 1,4g $NaH_2PO_4 . H_2O$
pH 7 + 500mg Natrium-Dodecylsulfat
+ 0,5ml Marcaptoäthanol
+ H_2O ad 500 ml

Amidoschwarz : 0,5% in 7% iger Essigsäure

Ammoniumperoxodisulfat : 0,15 % in H_2O
$(NH_4)_2 S_2O_8$

b) Herstellung der Proben : Die Kollagenkomponenten wurden durch Anwendung von CM-Cellulose- Chromatographie getrennt (vgl. S.114). Die Fraktionen wurden weitgehend eingeengt , gegen dest. H_2O dialysiert und gefriergetrocknet . Als Eichproteine für die Molekulargewichts-

bestimmung dienten : Myoglobin (MG 17000) aus Skelettmuskel (Serva , Heidelberg) , Aldolase (MG 40000) aus Kaninchenmuskel, 100 mg/10ml (Boehringer, Mannheim) , Katalase (MG 60000) aus Rinderleber , 250 mg /12,5ml (Boehringer , Mannheim) , Phosphorylase a (M.G 100000) aus Kaninchenmuskel , (Boehringer , Mannheim).

In den Reagensgläsern wurde in je 1ml Probenpuffer gelöst :
2mg des Kollagenpräparates
1mg Myoglobin
0,025 ml der Katalasesuspension
0,05ml der Aldolasesuspension und
0,5mg Phosphorylase a .
Die Reagensgläser wurden mit Parafilm verschlossen und 2 Std. in ein warmes Wasserbad (40^0) gestellt .

c) Herstellung der Trenngele :

in ein 50ml Becherglas wurden
5ml Gelpuffer
5ml Acrylamidlösung
0,1ml 6%ige TEMED und
10ml 0,15 % ige frische Ammoniumperoxodisulfatlösung einpipettiert.
Die Lösung wurde sofort luftblasenfrei in die Gelröhrchen eingefüllt und mit wenig Wasser überschichtet . Nach einer Stunde bei Zimmertemp. sind die Gele verwendungsfähig .

d) Elektrophorese :
In den Mikroreagensgläsern wurden die Probemischungen zubereitet :
10ml 0,5%ige Bromphenolblaulösung
4 Tropfen Glycerin
20 ul Mercaptoäthanol
200 ul Probenpuffer
200 ul Probelösung

Nachdem von den Gelen das Wasser abgeschleudert wurde , wurden 50ul der Probenmischung aufgetragen . Darüber wurde 1:1 verdünnter Gelpuffer geschichtet und die Röhrchen ins Gestell der Elektrophorese-Einrichtung eingesetzt . Als Elektrodenpuffer wurde 1:1 verdünntes Gelpuffer verwendet . Bei einem Strom 4 µA/Röhrchen dauerte die Elektrophorese 3-4 Stdn. Nach der Elektrphorese wurde die Gele mit 0,5%iger Amidoschwarzlösung angefärbt . Entfärbt wurden die Gele in 7% Eisessig .

Auswertung : Auf halblogarithmischen Papier wurden die Mobilitäten gegen die zugehörige Molekulargewichte aufgetragen (Abb. 30).

Die Gleichung für die Mobilität (M) ergibt sich :

$$M = \frac{\text{Laufstrecke Protein}}{\text{Laufstrecke Bromphenolblau}} \times \frac{\text{Gellänge vor Färbung}}{\text{Gellänge nach Färbung}}$$

Es ergab sich eine Eichgerade (Abb. 30) , mit deren Hilfe die Molekulargewichte der einzelnen angefärbten Kollagen-Banden ermittelt wurden. Die Mobilitäten der Kollagen-Banden sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Tabelle 13. Mobilitäten der einzelnen Kollagen-Komponenten

Präparat (Tab. 3)	Mobilität von	
	α_1	α_2
Säurelösliches Kollagen K_1	0,360	0,380
Säurelösliches Kollagen K_2S	0,355	0,370
Pepsingelöstes Kollagen K_6	0,395	0,410
Pepsingelöstes Kollagen K_7	0,390	0,400

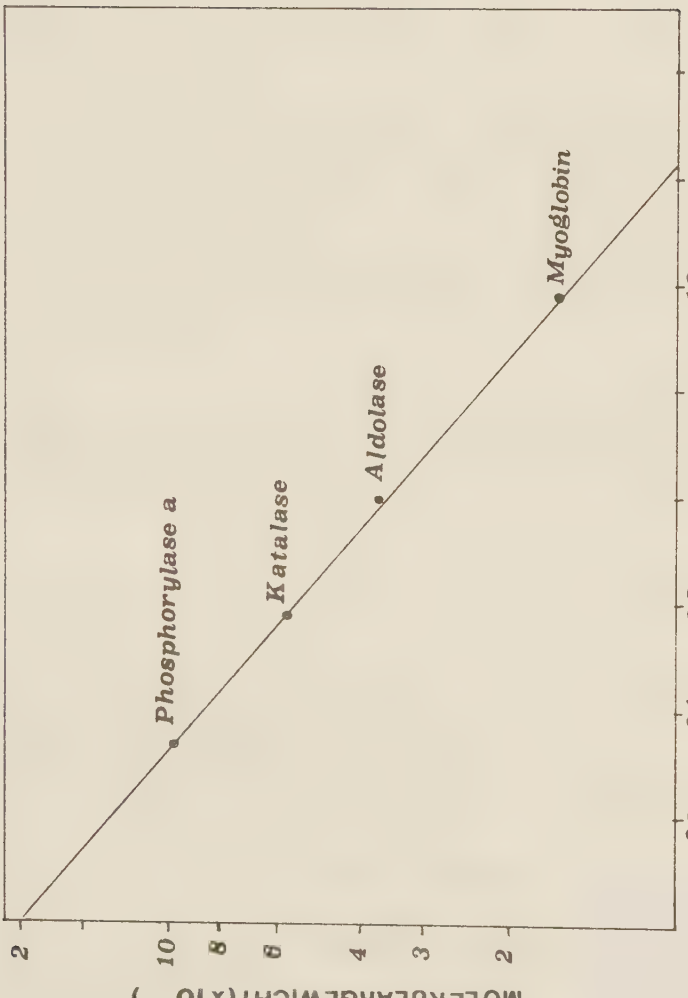


Abb. 29. Darstellung der relativen Wanderungsstrecke (elektrophoretische Mobilität) gegen den Logarithmus des Molgewichtes von Eichproteinen

Die in Tab. 13a aufgeführten Molekulargewichte verschiedener Placenta-Kollagen-Präparate sind Mittelwerte von fünf Bestimmungen . Die Molekulargewichte von säurelöslichen Kollagenen liegen im Größenbereich von 272000 -280000 . Diese Werte stimmen in der Größenordnung mit den für Kalbshaut-Kollagene ermittelten Werten überein (137) .

Die Molekulargewichte von pepsingelösten Kollagenen liegen unter denen säurelöslicher Kollagene , was auch zu erwarten war , da ja durch Enzymbehandlung während der Extraktion die Teleopeptide vom Kollagenmolekül abgespalten werden (vgl. S.**68**).

Diese Verkürzung beim Placenta-Kollagen beträgt 6-6, 5% (vgl. S.**68**). Davidson und Drake (25) berichteten eine Verminderung von 5% des Molekulargewichtes von Kalbshautkollagen durch Pronasebehandlung. Rubin et al (147) fanden daß die sogenannte Teleopeptiden , die nicht zur Triple -Helix -Konfiguration gehören, durch Enzymbehandlung abgespalten werden . Nishihara (119) berichtet einen Verlust von 10% des Kollagenmoleküls nach Pepsinbehandlung :

Tabelle 13a. Molekulargewichte von verschieden gereinigten säurelöslichen und pepsingelösten Placenta-Kollagen-Präparate

PRÄPARAT	Molekulargewicht von		
	α_1	α_2	$[(\alpha_1)_2\alpha_2]$ = Tropokollagen
Säurelösliches Kollagen K_1	92000	88000	272000
Säurelösliches Kollagen K_2S	93000	90000	276000
Pepsingelöstes Kollagen K_6	86000	84000	256000
Pepsingelöstes Kollagen K_7	87000	85000	259000

6. EIGENSCHAFTEN VON KOLLAGENEN

6.1. Viskosität

Viskositätseigenschaften ermöglichen einen Einblick in Form , Größe und Konformation eines Biopolymers . Die Messung der Viskosität stellt daher eine besonders einfache , bequeme und wenig kostenintensive Methode zur Charakterisierung von Polymeren dar .

In der vorliegenden Arbeit wurde die Intrinsic-Viskosität von Placenta-Kollagenen im Ostwaldschen Kapillarviskosimeter gemessen und nach der Gleichung

$$[\eta] = \lim_{c \longrightarrow 0} \frac{1}{c} \left(\frac{t}{t_1} - 1 \right)$$

berechnet , wobei t und t_1 die Durchlaufzeit der Lösung und des Lösungsmittels in Sek. und c die Konzentration des Kollagens in g/ 100ml bedeuten .

Die Proben wurden in Citrat - Puffer vom pH 3,5 gelöst und die reduzierten Viskositäten im Konzentrationsbereich 0,025 bis 0,036% bei 21 ^{0}C gemessen .

In Abb. 30 ist der Verlauf der reduzierten Viskosität für Placenta-Kollagen-Präparate in Citrat-Puffer dargestellt . Aus fünf Bestimmungen von Intrinsic-Viskositäten errechnet sich für die Viskositätszahl $[\eta]$ ein durchnittlicher Wert von $13,2 \pm 1,5$ für säurelösliche Kollagene , $12,0 \pm 2,0$ für pepsingelöste Kollagene .
Der niedrigere Wert für pepsingelöstes Kollagen ist auf die Abtrennung der Begleitkomponenten durch Pepsinbehandlung zurückzuführen . Die Fähigkeit der säurelöslichen Kollagen zur Aggregation nimmt durch Enzymbehandlung ab , wie durch Änderung der Viskositätszahl zeigt.

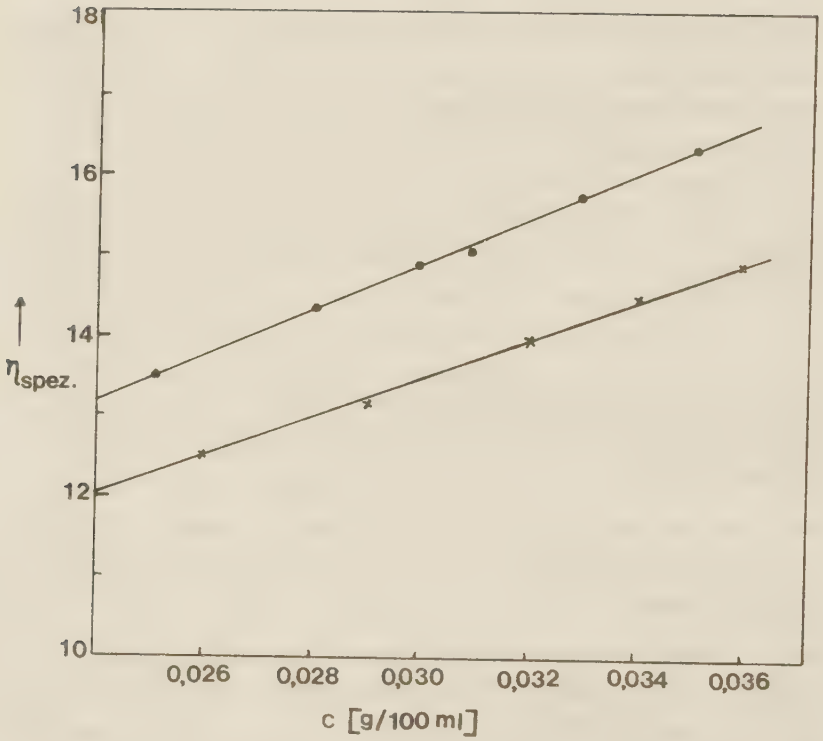


Abb. 30. Reduzierte Viskositäten von Placenta-Kollagen-Präparaten

• = Säurelösliches Kollagen

x = Pepsingelöstes Kollagen

6.2. Optische Drehung

Gelöstes Tropokollagen zeigt eine hohe spezifische Linksrotation. Die Größe des Drehwertes hängt davon ab , ob das Kollagen in nativer oder denaturierter Form vorliegt (135) .
In der vorliegenden Arbeit wurde die Messung der optischen Drehung in einem Schmidt-Haensch-Polarimeter bei Natriumlicht 589 mμ durchgeführt .
Hierbei wurden 0,1g der Placenta-Kollagen-Präparate in 0,1M Citrat-Puffer vom pH 3,7 gelöst und die optische Drehung bei 21 ^{0}C gemessen (Tab. 14).

Tab. 14 . Spez. Drehung verschieden gefriergetrockneter Kollagen-Präparate bei 21 ^{0}C und λ = 589 mμ .

Kollagen-Präparate	Säurelösliche Kollagene			Pepsingelöste Kollagene	
(Tab. 3)	K_1	K_2S	K_4	K_6	K_6S
$-[\alpha]_D^{21°}$	370	390	375	335	350

Durch Vergleich mit nativen Kollagenen läßt sich mittels Drehwertmessungen feststellen , ob irgendwelche Veränderungen durch Enzymwirkung aufgetreten sind . Die zu erwartenden niedrigeren Werte der optischen Drehungen der enzymgelösten Kollagene ist auf die geringere Ordnung des pepsingelösten Kollagens gegenüber nativem oder auf eine Schädigung bestimmter Gruppierungen während des pepsinangriffs zurückzuführen.

6.3. Denaturierung und Renaturierung

Eine wichtige Eigenschaft des Kollagens wie bei allen Proteinen ist die Denaturierung durch Hitze bzw. durch chemische Einwirkung. Das Wesen der Denaturierung des Kollagens besteht in der Hauptsache in einer Aufspaltung der intramilekularen Bindungen . Dabei zerfällt kolloidal gelöstes Kollagen in zwei Stufen (34) . Zuerst bricht die native Struktur der Tropokollagenmoleküle zusammen . Erst nach längerem Erwärmen verknäulen sich dann die Polypeptidketten . Kühlt man die kollodale Lösung in der ersten Denaturierungsstufe ab , so kann sich die native Struktur wieder ausbilden (Renaturierung) .

Zur Ermittlung von Denaturierungstemperatur (T_m-Werte) von Placenta-Kollagen-Präparate wurde die optische Drehung von Kollagenlösungen (0,1% in Citrat-Puffer , pH 3,5) bei verschiedenen Temperaturen gemessen (Schmidt-Haensch-Polarimeter) , bei 20^0C beginnend , in Abständen von 2-3 ^{0} gesteigert , nach 10-15 Min. Verweilen auf jeder Temperaturstufe .
Aus den Schmelzkurven von säurelöslichen bzw. pepsingelösten Kollagen-Präparaten in Abb. 31 ergeben sich für die Denaturierungstemperatur (T_m) die Werte von 35,4 bzw. 32,9 ^{0}C .

Die Denaturierung der pepsingelösten Kollagene stezt um etwa $2,5^0$ früher ein als bei säurelöslichen Kollagenen . Durch die Enzymbehandlung hat die Stabilität der Dreikettenschraube geringfügig gelitten.

Im Laufe der Bestimmungen der T_m-Werte von verschieden Placenta-Kollagen-Präparate wurde festgestellt , daß die T_m-Werte vom pH des Lösungsmittels und dem Hydroxyprolin-Gehalt der Präparate abhängig sind .
Zur Untersuchung der pH-Effekte auf die T_m-Werte wurden die Kollagen-Präparate in verschiedenen Lösungsmitteln , pH 1,5 bis 7,0 gelöst (0,1% ige Kollagenlösung) und die T_m-Werte von Kollagenen

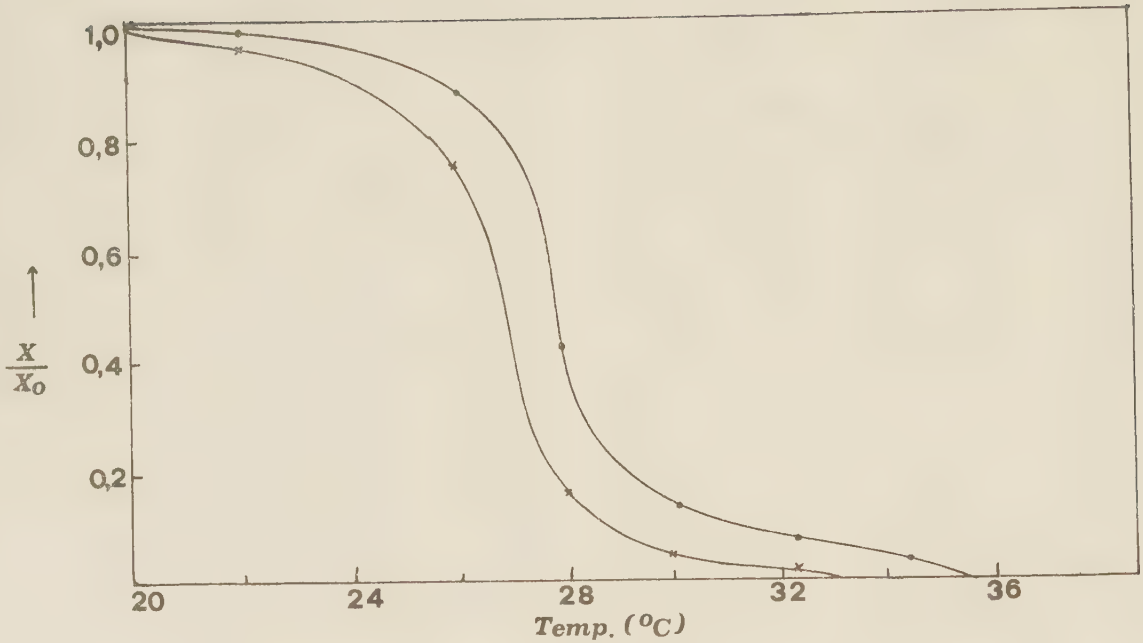


Abb. 31. Schmelzkurve für Placenta-Kollagen-Präparate (• = Säurel. Kollagen, x= Pepsingel. Kollagen)

$$\frac{X}{X_o} = \frac{(\alpha^t - \alpha^{40})}{(\alpha^{25} - \alpha^{40})}$$, wobei α^t und α^{40} die Werte der optischen Drehung bei t und 40^0C sind. α^{25} ist die optische Drehung nach der Renaturierung bei 25^0C.

gegen pH der Lösungsmittel aufgezeichnet . Dabei ergibt sich eine S-Typ-Kurve (Abb. 32). Diese nichtlineare Abhängigkeit der T_m-Werte vom pH des Lösungsmittels kann mit der Dissoziation der Seitenketten der Carboxylgruppen in Beziehung gebracht werden . Die Labilität der Kollagenmoleküle bei niedrigen pH-Werten kann auf die abstoßenden Kräfte der überschüssigen posiven Ladungen zurückgeführt werden (26) .

Die Ermittlung der T_m-Werte von verschiedenen Kollagen-Präparaten (Kollagen gelöst in 0,1M Citrat-Puffer , pH 3,7) mit unterschiedlichem Hydroxyprolingehalt zeigte einem Zusammenhang zwischen Hydroxyprolingehalt der Präparate und den T_m-Werten .

In Abb. 33 sind die T_m-Werte in Abhängigkeit von Hydroxyprolingehalt aufgezeichnet , wobei auffält , daß die T_m-Werte vom Hydroxyprolin gehalt direkt abhängig sind . Die Hydroxyprolinreichen Kollagene zeigen größere Stabilität der Kollagenmoleküle . Dies bedeutet , daß Hydroxyprolin eine bedeutende Rolle bei der Stabilität des Kollagenmoleküls spielt .

Um einen Renaturierungsvorgang nachzuweisen , wurden die beiden Präparate (K_2 und K_6) in 0,1M Citrat-Puffer , pH 3,5 gelöst (1mg/ml), bei 45 ^{0}C 30 Min. denaturiert und die Lösungen dann isothermisch bei 25^{0}C renaturiert .
Durch Messung der optischen Drehung wurde versucht , einen eventuell staatgefundene Renaturierungsvorgang festzustellen bzw. zu verfolgen. Bei den Versuchen wurde festgestellt , daß die optischen Drehungen denaturierter Kollagenlösungen in der Kälte wieder ansteigen, aber nicht zu den Ausgangswerten , d.h. die Helixkonfiguration wird nur teilweise zurückgebildet (Abb. 34) .

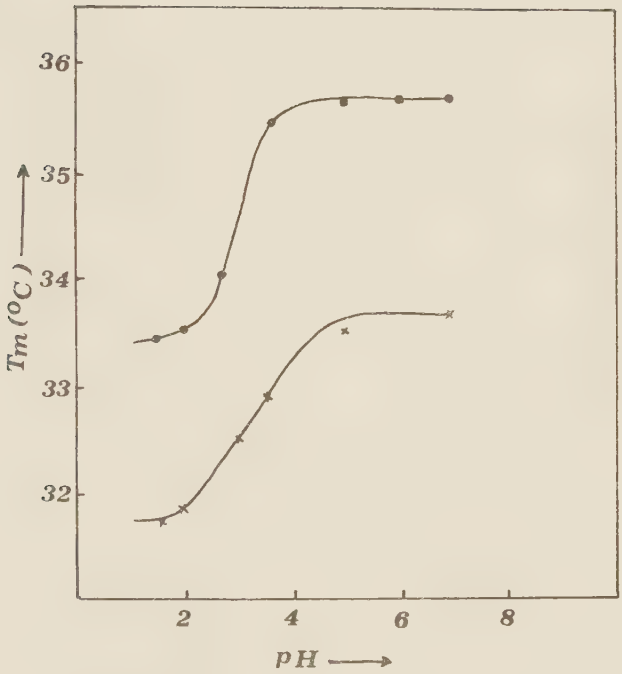


Abb. 32. pH-Abhängigkeit der T_m-Werte von Placenta-Kollagenen.

• = Säurelösliches Kollagen K_1

× = Pepsingelöstes Kollagen K_6

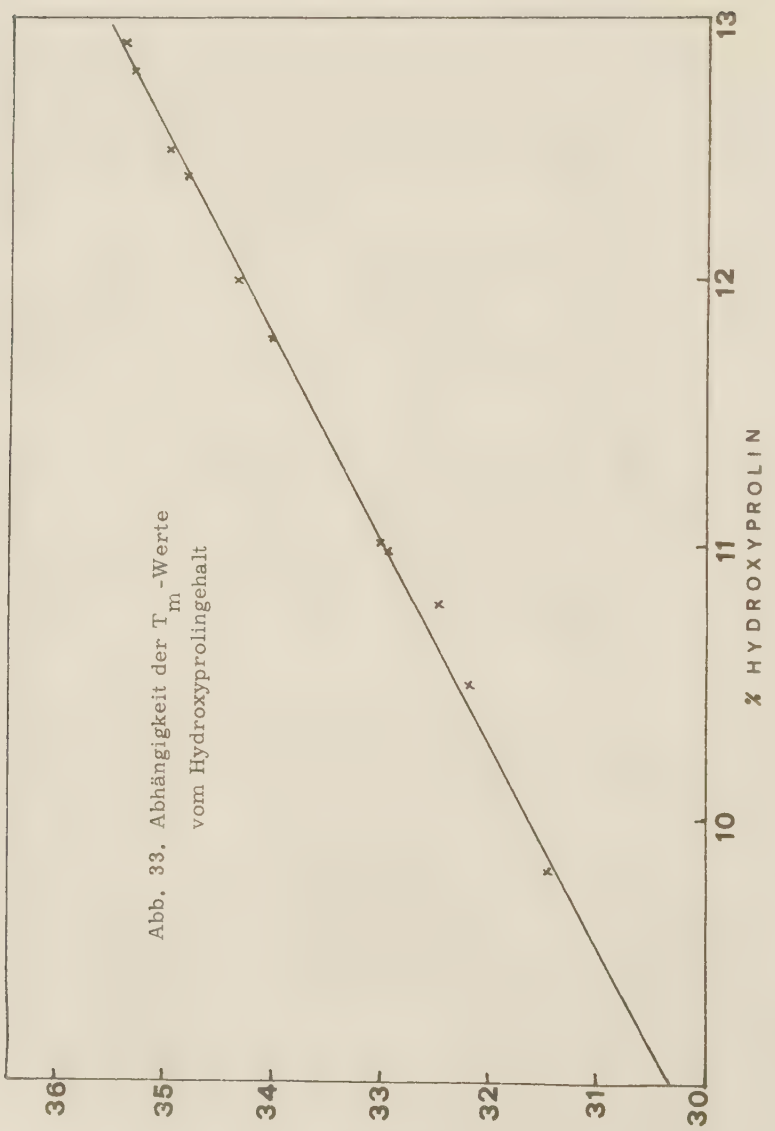


Abb. 33. Abhängigkeit der T_m-Werte vom Hydroxyprolingehalt

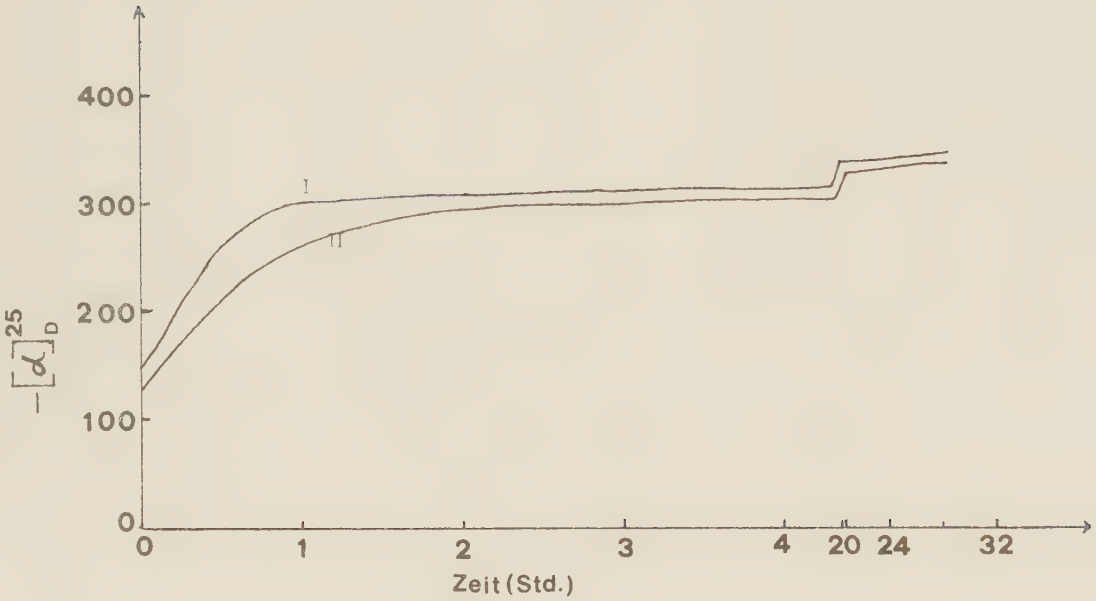


Abb. 34. Zunahme der negativen optischen Drehung als Funktion der Renaturierungszeit. I = Säurel. Kollagen , II = Pepsingel. Kollagen

6.4. Wiederlöslichkeit

Lösliche Kollagenpräparate werden nach längerem Aufbewahren in trockenem Zustand zum Teil wieder unlöslich (138). Unlöslichwerden ist wahrscheinlich auf die Ausbildung kovalenter Quervernetzungen zurückzuführen .
In der vorliegenden Arbeit wurde die Wiederauflösung der verschiedenen Kollagen-Präparate untersucht.
Für die Wiederauflösungsversuche wurden 0,1M Citrat-Puffer , pH 3,7 und 0,1M Essigsäure in einem Verhältnis von Lösungsmittel : Kollagen 100 : 1 verwendet . Nach 24 Std. Rühren bei 4^0C wurde der wiedergelöste Anteil durch Hydroxyprolinbestimmung ermittelt .

Aus der Tabelle 15 geht hervor , daß die Wiederlöslichkeit eines Kollagens , das aus Essigsäurelösung gewonnen wurde , etwas niedriger ist als die von Kollagen , das aus Citrat -Puffer-Lösung gewonnen wurde . Ferner ist die Wiederlöslichkeit von über Segment-Long-Spacing (SLS) gereinigten und Enzymgelösten Kollagenen größer . Das ist darauf zurückzuführen , daß die SLS-umkristallisierten und pepsingelösten Kollagene wenige Begleitkomponenten haben . Je unreiniger die Fibrillen sind , desto weniger lösen sie sich nach Alterung , d.h. die Begleitkomponenten beeinflussen die Wiederlöslichkeit .

6.5. Stabilisierung des Kollagens

Zahlreiche Untersuchungen über die Thermolabilität von verschiedenen Kollagenen zeigten , daß die Stabilisierung des Kollagenmoleküls entweder mit ihrem Hydroxyprolingehalt oder Gesamtiminosäuregehalt (Prolin + Hydroxyprolin) korreliert werden (37, 52, 57) .
Über die Rolle von Hydroxyprolin in Kollagen zeigen einige Untersuchungen , daß ein Zusammenhang zwischen Thermostabilität und Hydroxyprolingehalt von Kollagen besteht .

Tabelle 15 . Wiederlöslichkeit verschiedener gefriergetrockneter Placenta- Kollagen-Präparate

Präparat (vgl. Tab. 3)	Lösungsmittel	Wiedergelöste Anteil (%)
Säurelösliches Kollagen K_1	0,1M Essigsäure , pH 2,9	78,1
	0,1M Citrat-Puffer, pH 3,5	75,5
Säurelösliches Kollagen K_2	0,5M Essigsäure, pH 3,0	84,5
	0,1M Citrat-Puffer, pH 3,7	82,5
Säurelösliches Kollagen K_1S	0,1M Essigsäure, pH 2,9	88,o
	0,2M Citrat-Puffer, pH 3,5	85,0
Neutralsalz-lösliches Kollagen K_5	0,5M Essigsäure, pH 3,0	75,1
	0,2M Citrat-Puffer pH 3,7	73,0
Pepsingelöstes Kollagen K_6	0,1M Essigsäure, pH 2,9	90,0
	0,1M Citrat-Puffer, pH 3,7	92,0
Pepsingelöstes Kollagen K_7S	0,5M Essigsäure, pH 3,0	95,0
	0,1M Citrat-Puffer, pH 3,5	94,1

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es , die Rolle des Hydroxyprolins zur Stabilisierung des säurelöslichen bzw. pepsingelösten Placenta-Kollagene zu vergleichen.

Zur Untersuchung der Rolle des Hydroxyprolins bei der Stabilisierung des Kollagens wurde die Pronase-Empfindlichkeit von zwei Placenta-Kollagen-Präparaten (K_2 u. K_7) mit unterschiedlichem Hydroxyprolingehalt durch Viskositätsmessung und Untersuchung in Gelfiltration verglichen.
Es wurde je 1omg gefriergetrocknete Kollagen -Präparat in 5ml 0,05M Tris/HCl , 0,05M $CaCl_2$, pH 7,5 gelöst und 4 Std. bei 37 ^{0}C mit Pronase (Kollagen : Enzym = 1 : 25) behandelt . Die spezifischen Viskositäten der Kollagenlösungen wurden während der Inkubationszeit im Ostwald-Viskosimeter mit Fließzeiten von ca. 66,6 Sec. in Wasser bei 22^{0}C gemessen .

Gelfiltration wurde mit Sephadex G-200 , mit 0,05M Tris/HCl ,1M $CaCl_2$, pH 7,5 als Elutionsmittel durchgeführt . Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 18 ml/ Std. ; die Absorption des Eluats wurde im DB-Spektralphotometer bei 230nm gemessen.

Abb. 35 zeigte den Verlauf der spezifischen Viskositäten der beiden Kollagen-Präparate , die während der Inkubationszeit gemessen wurden. Nach einer Stunde wurde eine bedeutende Viskositätsabnahme von pepsingelösten Kollagen-Präparaten festgestellt : die Viskositäten von säurelöslichem bzw. von pepsingelöstem Kollagen waren nach einer Stunde Pronasebehandlung auf 30% bzw. 50% gesunken.
Nach 4-stündiger enzymatischer Behandlung zeigte pepsingelöstes Kollagen eine Viskositätsabnahme von 80 , während bei dem säurelöslichen Kollagen eine Abnahme von 76% festgestellt wurde . Die Geschwindigkeit der Viskositätsabnahme von säurelöslichem Kollagenpräparat ist niedriger als die von pepsingelöstem Kollagen .
Pronasebehandelte und unbehandelte Kollagen-Präparate wurden durch Gelfiltration nach 4-stündiger Inkubation analysiert . Die an Sephadex

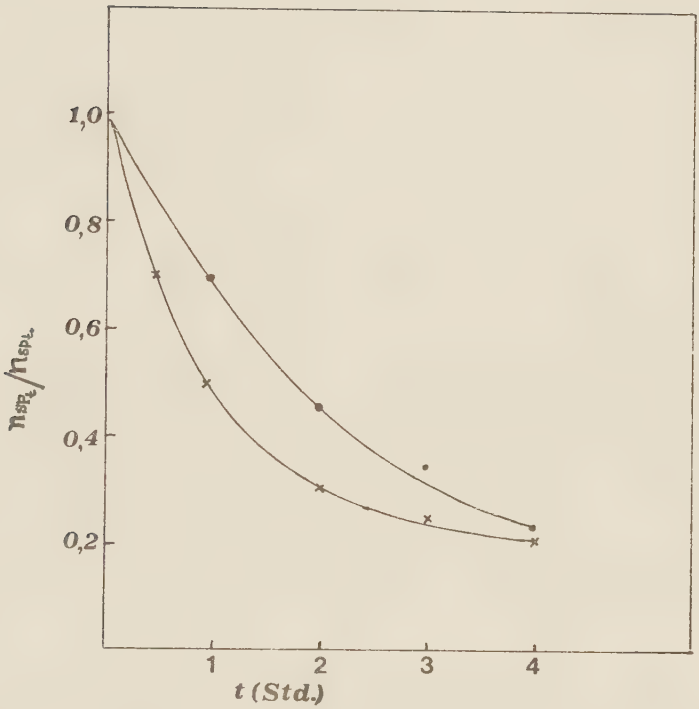


Abb. 35. Effekt von Pronase auf die Viskosität von säurelöslichen und pepsingelösten Kollagenen

Säurelösliches Kollagen ,

Pepsingelöstes Kollagen.

(η_{sp_t} und $\eta_{sp_{t_0}}$ sind die Werte von Viskositäten bei t und $t_0{}^0C$) .

G-200 durchgeführte säulenchromatographische Trennung von den Kollagenlösungen ergab die in Abb. 36, 37 wiedergegebenen Kurven. Kurve I repräsentiert die unbehandelten Kollagenmoleküle bei der Gelfiltration . In Abb. 36 ist die Kurve II (Peak a') nach Pronase-behandlung des säurelöslichen Kollagens , das einen 32%igen Verlust der ursprünglichen Absorption (Peak a , Kurve I) zeigt. Bei pepsin-gelöstem Kollagen ist der Verlust über 40% (Abb. 37 , Peak a') . Dieser Unterschied beruht auf der höheren Pronase-Empfindlichkeit von pepsingelöstem Kollagen , das einen niedrige Hydroxyprolingehalt besitzt als säurelösliches Placenta-Kollagen .

Beim Peak b' (Abb. 36) wurden eine Absorptionsabnahme von über 29% , beim pepsingelösten Kollagen (Peak b' , Abb. 37) eine Absorptionsabnahme über 50% festgestellt .

Die Absorptionsabnahme bestätigt , daß die Enzymempfindlichkeit dem Hydroxyprolingehalt proportional ist , d.h. es besteht ein Zusammenhang zwischen Stabilität des Kollagenmoleküls und Hydroxyprolingehalt . Nach Fujimoto (37) beeinflusst Hydroxyprolin die strukturelle Stabilität des Kollagenmoleküls nicht nur wegen seines Pyrolidinringes sondern auch durch die H-Brücken zwischen Hydroxylgruppen und Hydroxyprolinresten .

Als weiterer die Stabilität des Kollagenmoleküls bestimmender Faktor ist die Rolle des Wassers hervorzeigen . Das Wasser ist in Form kettenartiger Assoziate zwischen den Kollagenmolekülen angeordnet. Dabei sind H_2O-Moleküle untereinander und über Wasserstoffbrücken mit den CO - und NH-Gruppen benachbarter Protofibrillen verbunden (11, 107) .

Zur Ermittlung der Wasserbindefähigkeit der löslichen Placenta-Kollagen-Präparate werden die Desorptionsgeschwindigkeiten der Präparate mit Hilfe eines Gefriertrockners (Leybold-Heraeus GT 2) aufgenommen (Abb. 38) .

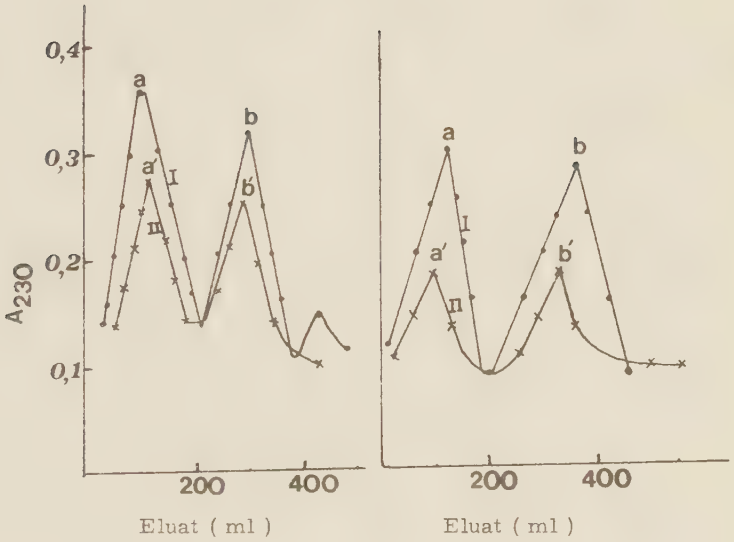


Abb. 36. Sephadex G-200 Gel-Filtration von säurelöslichem Kollagen vor (•—•) und nach (x—x) Pronasebehandlung .

Abb. 37 . Sephadex G-200 Gel-Filtration von pepsingelöstem Kollagen vor (•—•) und nach (x—x) Pronasebehandlung.

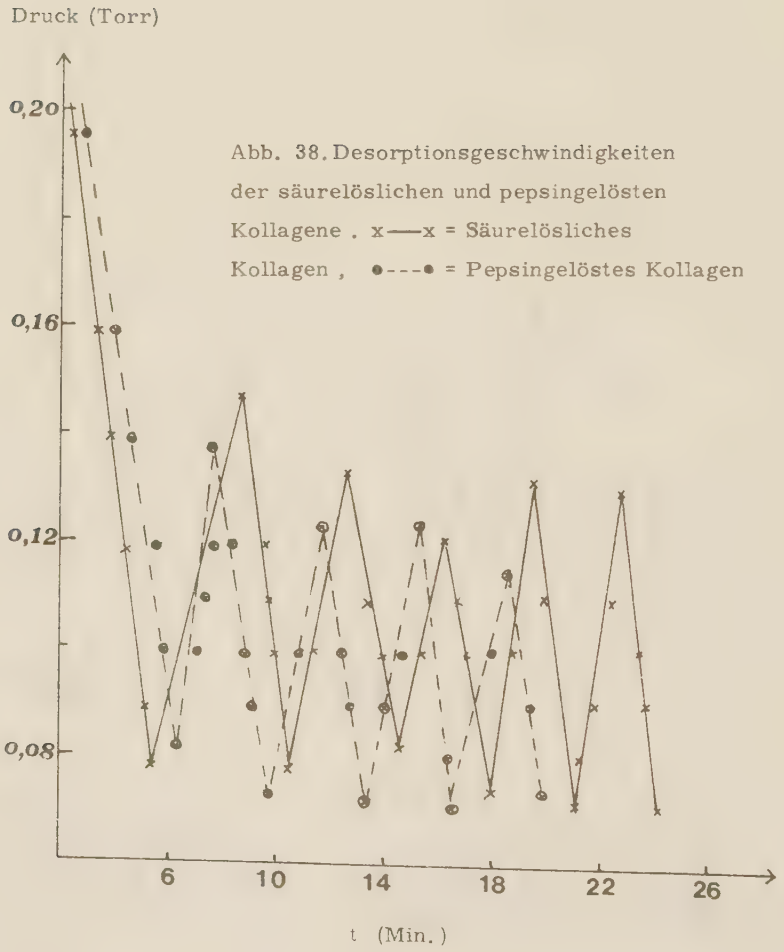


Abb. 38. Desorptionsgeschwindigkeiten der säurelöslichen und pepsingelösten Kollagene . x——x = Säurelösliches Kollagen , ●---● = Pepsingelöstes Kollagen

Dabei ergab sich , daß das pepsingelöste Kollagen etwas scwächere Bindefähigkeit als das säurelösliche Kollagenpräparat besaß . Die Wasserbindefähigkeiten der beiden Präparate unterscheiden sich jedoch nur sehr gerigfügig .

Um einen Vergleich der Wassergehalte bzw. Wasseraffinitäten der verschiedenen Kollagen-Präparate zu ermöglichen , wurden Sorptionsmessungen durchgeführt . Es wurden verschiedene gefriergetrocknete Kollagen-Präparate längere Zeit bei 4^0C gelagert . Zur Herstellung der Sorptionsisothermen wurden die getrockneten Präparate von Kollagen gewogen (30 mg) , die Wasseraufnahme von feuchten Umgebung mit der Zeit ermittelt und in der Abb. 39 aufgezeichnet .

Durch Sorptionsmessung wurde festgestellt , daß mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Wasseraffinität zu Kollagenfaser besteht und somit die Fibrillen dichter gepackt sind . Diese Befunde lassen erkennen, daß das Wasser eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Stabilität der Kollagenmoleküle spielt .

Inwieweit Ladungsänderungen des Kollagenmoleküls während der Lagerung auftreten und somit die Reaktion des Wassers mit den Kollagenmolekülen verändern , ist noch nicht in Einzelheiten geklärt .

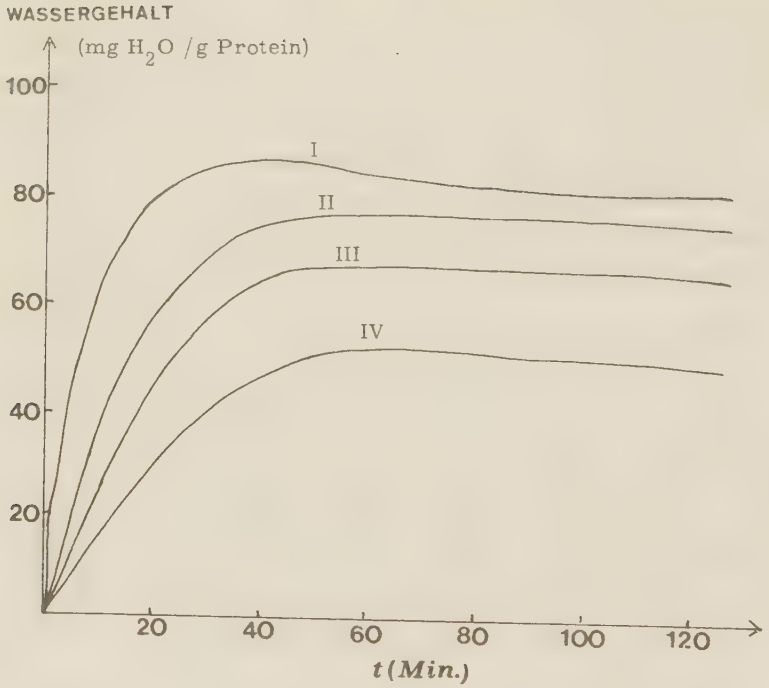


Abb. 39. Sorptionsisothermen der verschiedenen Placenta-Kollagen-Präparate .

I = Säurelösliches Kollagen(K_2), Lagerungszeit 2 Monate

II = Pepsingelöstes Kollagen(K_8), Lagerungszeit 2 Monate

III = Säurelösliches Kollagen(K_4), Lagerungszeit 4 Monate

IV = Säurelösliches Kollagen(K_1), Lagerungszeit 6 Monate

6.6. Komponenten

Tropokollagen , die lösliche Form des Kollagens , zerfällt bei der Wärmedenaturierung in wenigstens fünf Komponenten . Davon können drei (α , ß,γ) aufwendig in der Ultrazentrifuge (28, 45) bzw. durch Molekulrsieb-Chromatographie (129) , 4 (α_1 , α_2, β_{11} , β_{12}) durch Säulen-Chromatographie an CM-Cellulose (128, 130 , 150) getrennt werden .

Anhand der obengenannten Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit die Komponenten der verschiedenen Placenta-Kollagen-Präparate durch Anwendung von SDS -Gel -Elektrophorese (40) und Säulen-Chromatographie an CM-Cellulose getrennt .

Durch diese Versuche konnte festgestellt werden , ob die verschiedenen Placenta-Kollagen-Präparate (Säurelösliche , Neutralsalzlösliche und pepsingelöste) sich in ihren Untereinheiten unterscheiden .

a) Polyacrylamid -Gel -Elektrophorese :

Reagenzien zur Trennung der Kollagenkomponenten durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese :

Lösung A (5%ige Gel) : 10g Acrylamid und 0, 26g Methylenbisacrylamid wurden in 50ml 0, 2M Phosphat , pH 7, 2 und 1o ml 2% SDS gelöst . Nach Zugabe von 0, 1ml N, N, N', N' - Tetramethylendiamin (TEMED -6%) wurde das Gemisch mit bidest. Wasser auf 1ooml verdünnt .

Lösung B : 150 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100ml 0, 1M Phosphat pH 7, 2 , gelöst .

Zur Herstellung der Trenngele wurden die Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und sofort in Röhrchen eingefüllt . Mit einer Tropfpippete wird rasch mit wenig Wasser überschichtet , um das Austrocknen der Geloberfläche zu verhindern. Nach ca. einstündigem Stehen ist die Lösung zu einem Gel erstarrt .

Die verschieden Kollagen-Präparate (25mg) wurden in Phosphat (10ml 0,01M Phosphat Puffer , pH 7,2 , 1ml 0,2% SDS und 1ml 2M Harnstoff) gelöst und 30 Min. bei 50^{0}C denaturiert . Die hitzedenaturierten Kollagenlösungen , je 50 µl , wurden dann nach Entfernung des überstehenden Wassers übertragen und vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet . Die Elektrodengefäße wurden mit 0,1M Phosphat-Puffer , pH 7,2 , gefüllt , der 0,1g SDS pro 100ml Lösung enthält . Die Röhrchen wurden dann ins Gestell der Elektrophorese - Einrichtung eingesetzt . Bei einem Strom von 4 mA/Röhrchen dauerte die Elektrophorese 4-5 Stunden . Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit 0,25% Coomassie Brillant Blue R 250 (SERVA) in 20% Trichloressigsäure gefärbt und nach einigen Std. mit 7%igen Essigsäure entfärbt . Die Komponenten jedes Kollagen -Präparates konnten dabei in den Gelen gezeigt werden (Abb. 40, 41, 42).

Denaturierung und anschließende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zeigen für die Placenta-Kollagen-Präparate die Existenz von $\alpha_1, \alpha_2, \beta_{11}, \beta_{12}$ und γ bzw. hochquervernetzte Komponenten (Abb. 40 , Tab. 16). Ähnliche Quervernetzung wurde von Kalbshaut-Kollagen-Präparaten berichtet (158) . Unterschiedliche Komponenten wurden für säurelösliche , neutralsalzlösliche und pepsingelöste Kollagene beobachtet : Verminderung bzw. Abwesenheit von γ - und ß-Komponenten vor allem in neutralsalzlöslichen und pepsingelösten Kollagen-Präparaten (Abb. 41 , 42 / vgl. Tab. 16) .

Dieser Befund ließ erkennen , daß neben den intermolekularen auch intramolekulre Bindungen , welche die drei Peptidketten innerhalb der Molekeln vernetzen , durch Pepsinangriff gespalten werden . Das Ausmaß der Spaltung inter - und intramolelularer Bindungen ist von den Versuchsbedingungen , d.h. von der Pepsinmenge und Dauer der Pepsineinwirkung während der Extraktion abhängig .
Nach 20 Std. Einwirkung von Pepsin (Extraktionsmittel : 0,5M CH_3CO_2H, pH 2,0 ; Kollagen -Enzym -Verhältnis = 20 : 1) sind die ß-Komponenten kaum noch nachzuweisen (Abb. 42c) .

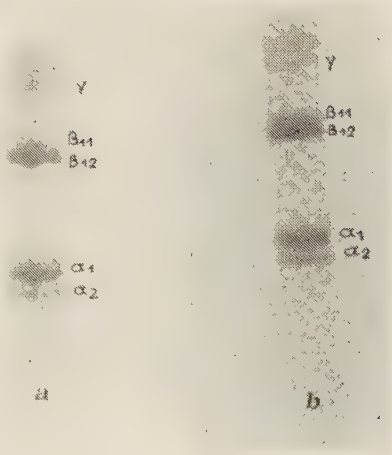


Abb. 40. Komponenten der säurelöslichen Kollagene (a= K_1, b=K_2)

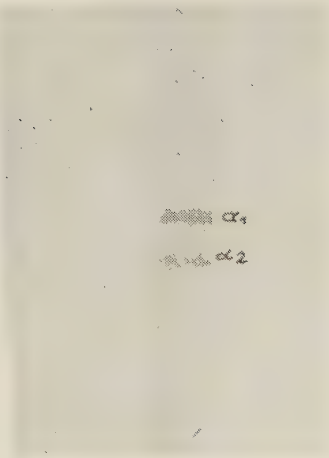


Abb. 41. Komponenten des neutralsalzlöslichen Kollagen K_5 .

Nach 24 Std, Extraktion unter Pepsinzusatz (Extraktionsmittel 0,5M HCOOH , pH 2,0 ; Kollagen : Enzym = 20 : 1) wurden nur α-Komponenten nachgewiesen (Abb. 42c´) . Bei einer Extraktion unter gleichen Bedingungen (Extraktionsmittel 0,1M CH_3COOH , pH 2,0 ; Kollagen : Enzym = 25 : 1) , nimmt auch der Gehalt an ß -Komponenten zwar deutlich ab , der Effekt ist jedoch geringer (Abb. 42 d) . Mit einer geringeren Menge von Pepsin (Kollagen : Enzym = 50 : 1 oder 100 :1, Extraktionsmittel 0,5M CH_3COOH) wurde kein deutlicher Effekt von Pepsin auf die inter - und intramolekularen Bindungen festgestellt (Abb. 42e bzw. 42e´) .

Das starke Überwiegen der α-Ketten gegenüber den ß-Komponenten in denaturierten pepsingelösten Placenta-Kollagenen kann als Effekt der Pepsineinwirkung gedeutet werden : Unter ihrer Einwirkung können nichthelikale Bereiche an C - und N-terminalen Ende abgespaltet werden, auf denen die inter -und intramolekularen Bindungen überwiegend lokalisiert sind . Infolge des Fehlens intramolekularer Bindungen führt anschließendes Denaturieren der Helix-Moleküle zu einem starken Anstieg der α -Ketten gegenüber den ß-Komponenten (Abb. 42) .

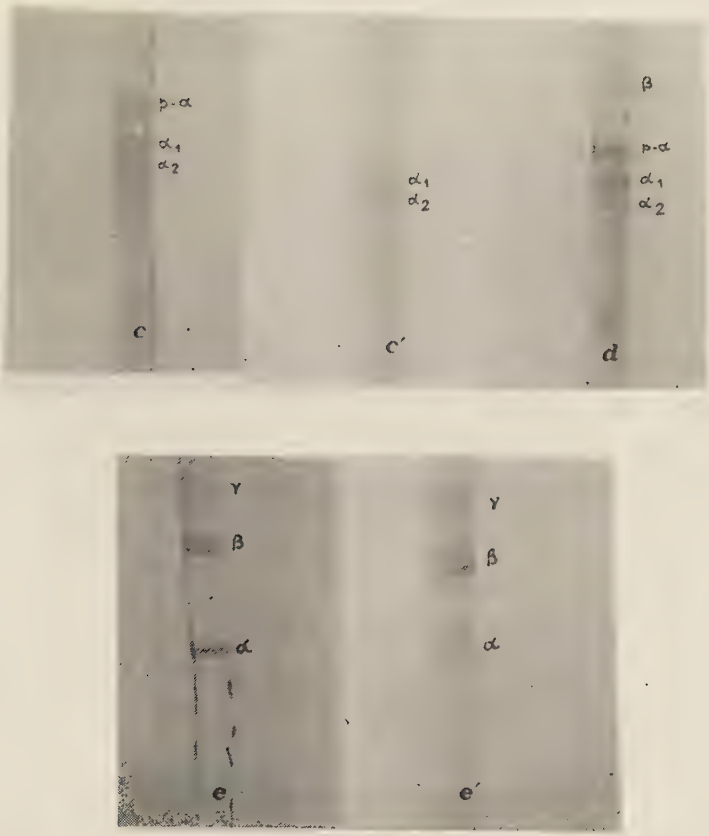


Abb. 42. Komponenten der pepsingelösten Kollagene :
(c= K_7; c´ = K_8; d = K_6 ; e = vgl. S.**33** ; e≙K_{11})

Tab. 16. Elektrophoretische Trennung von Komponenten der löslichen Placenta - Kollagen- Präparate

Kollagentyp	Kollagen -Präparat	Komponenten
Säurelösliches Kollagen	Nr. 1 (S. 137)	α, β, γ (Abb. 40a)
Säurelösliches Kollagen	Nr. 2 (S. 139)	α, β, γ (Abb. 40b)
Säurelösliches Kollagen	Nr. 4 (S. 139)	α, β, γ
Neutralsalzlösl. Kollagen	Nr. 5 (S. 140)	α (Abb. 41)
Pepsingelöstes Kollagen	Nr. 6 (S. 142)	α, β (Abb. 42d)
Pepsingelöstes Kollagen	Nr. 7 (S. 144)	α (Abb. 42c)
Pepsingelöstes Kollagen	Nr. 8 (S. 144)	α (Abb. 42ć)
Pepsingelöstes Kollagen	Nr. 11(S. 146)	α, β, γ (Abb. 42é)

Nach BrCN-Abbau zeigen säurelösliches und pepsingelöstes Kollagen aus Rinderplacenten ein unterschiedliches Peptidnuster (Abb. 43).
Die BrCN-Spaltung der Kollagene erfolgte in Anlehnung an Bornstein und Piez (15). (Eine Erläuterung des BrCN-Abbaus der Proteine auf der Seite **112**).

Bromcyan-Spaltung von Placenta-Kollagenen : Je 150mg gefriergetrocknete säurelösliche (K_2) -und pepsingelöste (K_7) Kollagen-Präparate wurden in 25 ml 70% ige Ameisensäure gelöst , eine dem Gewicht des Kollagens entsprechende Menge BrCN hinzugefügt und die Mischung im verschlossenem 1ooml Kolben unter Schütteln 4Std. auf 30^0C erhitzt. Zur Entfernung der Ameisensäure und des Bromcyans wurde die Mischung mit H_2O auf 125 ml verdünnt , 3 Tage gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet .

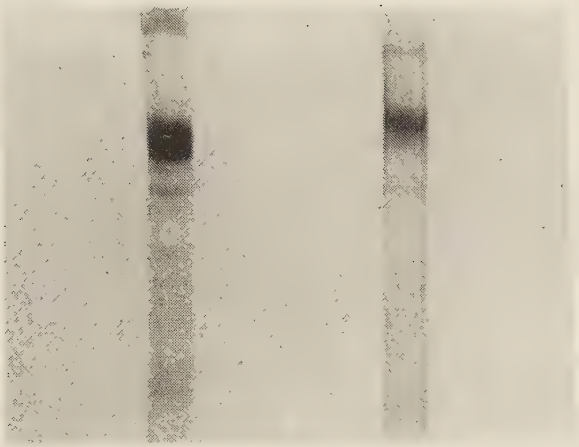
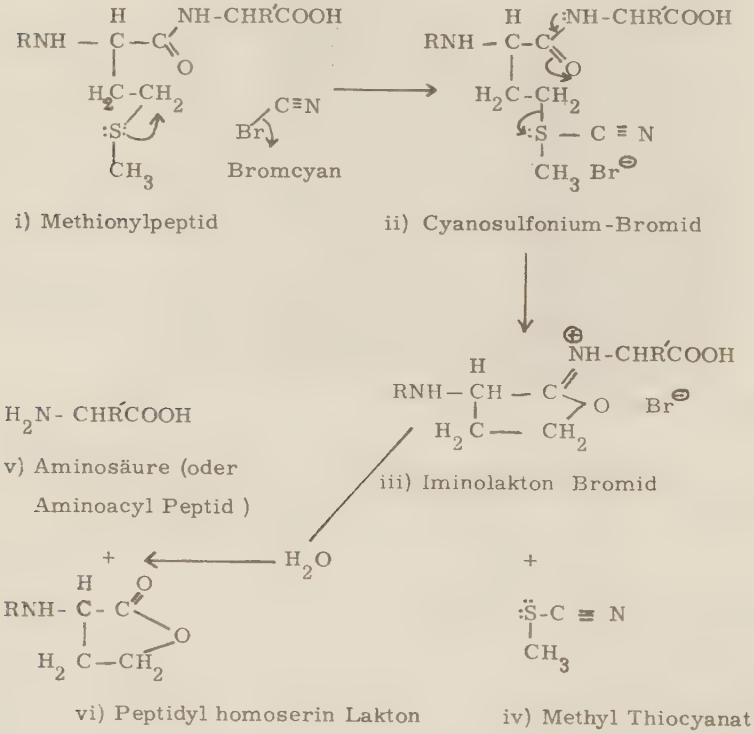


Abb. 43. SDS- Gel-Elektrophorese von CNBr-Peptide der säurelöslichen (Kollagen K_2) und pepsingelösten (Kollagen K_7) Kollagene

Bromcyan - Abbau der Proteine :

Der Effekt von Bromcyan auf Proteine ist durch seinen selektiven Angriff auf Methionin charakterisiert . Nach Gross und Witkop (47) reagiert BrCN mit Methionin unter milden Bedingungen durch Spaltung von Methionylpeptidbindungen nach folgendem Schema :



Die Reaktion zwischen Methionin und BrCN wird durch den starken C = O Nachbargruppeneffekt bedeutend erleichtert . Unter dem Einfluß der Schwefel -Funktion des Methionins auf das Bromanion erfolgte Polarisierung :

$$Br^{\delta\ominus} - C \equiv N^{\delta\oplus}$$

Die formulierte Cyanosulfonium - Bromid -Form (ii) des Methionins wurde nicht isoliert . Das Iminolakton (iii) ist in wässrigem , saurem Medium unstabil und wird leicht zu Homoserin (vi) hydrolysiert , wobei die Nachbaraminosäure oder Aminoacylpeptide des Methionins abgespalten werden . Demzufolge wird Methionin , das ursprünglich eine Endoposition besaß , zu Homoserin (Lakton) umgewandelt (vi) , das eine COOH- Terminalaminosäure eines Peptidfragmentes wird .

Ähnliche Nachbargruppeneffekte treten bei der nichtenzymatischen Spaltung von Tryptophyl und Tyrosyl - Peptidbindungen auf . In Jedem Fall ist die Spaltung einer Peptidbindung durch Bildung eines Iminolaktons bedingt . Ein Reagenz , das eine nichtenzymatische Abspaltung einer Peptidbindung bewirkt , soll normalerweise nur mit einem Aminosäure-Typ reagieren . Die Bedingungen für den Abbau sollen mild sein , um die unspezifische Spaltung der anderen Peptid-Bindungen zu vermeiden . Durch Anwendung von Bromcyan werden diese Bedingungen in großem Maße erfüllt .

b) Carboxymethyl-Cellulose-Chromatographie

Zur Trennung der Komponenten der beiden Präparate (Kollagen K_2- und K_6, vgl. Tab. 3) wurden jeweils 60 mg gefriergetrocknetes Kollagen in 15 ml 0,1M Essigsäure gelöst. Zur Denaturierung wurde die Lösung 30 Min. auf 40^0C erwärmt und die anschließende Trennung der α - und ß-Komponenten an einer temperierte (40^0) CM-Cellulose-Säule durchgeführt .

Als Elutionsmittel dienten Natriumacetat-Puffer verschiedener Konzentration vom pH 4,8 . Nach vier Std. Elution mit 0,075M Puffer wurden 0,17M Puffer durch ein mit 500ml 0,075 M Puffer gefülltes Mischgefäß der Säule zugeführt . Anschließend wurde ohne Gradient mit 300ml 0,5M Natriumacetat-Puffer gespült . Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 70ml / Std. Die Ausschlüsse aus der Säule wurde mit einem Fraktionssammler aufgefangen . Aus den mit 10ml gefüllten Auffangsgläsern wurden aliquote Teile Eluat zur Messung der Absorption entnommen. Die Absorption wurde im DB-Spektralphotometer bei 226 nm gemessen.

Die an CM-Cellulose durchgeführte säulenchromatographische Trennung von Placenta-Kollagen-Präparaten ist in den Abb. 44 u. 45 dargestellt. Die Ergebnisse der Trennung der α-und ß-Komponenten von löslichen Placenta-Kollagenen stimmen im wesentlichen mit denen von SDS-Gel-Elektrophorese überein (Abb. 40b , 42d) . Bei pepsingelöstem Kollagen wurde keine γ-Komponente nachgewiesen (Abb. 45).

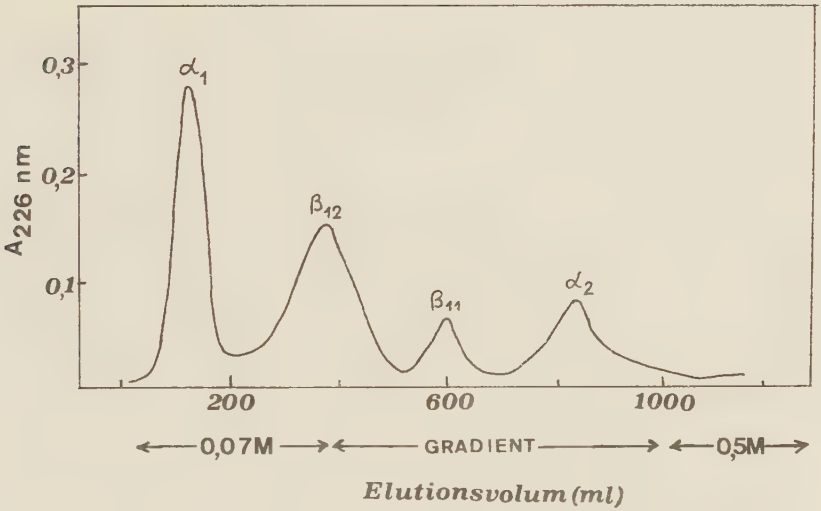


Abb. 44. Säulenchromatographische Trennung von denaturiertem säurelöslichem Kollagen (K_2)

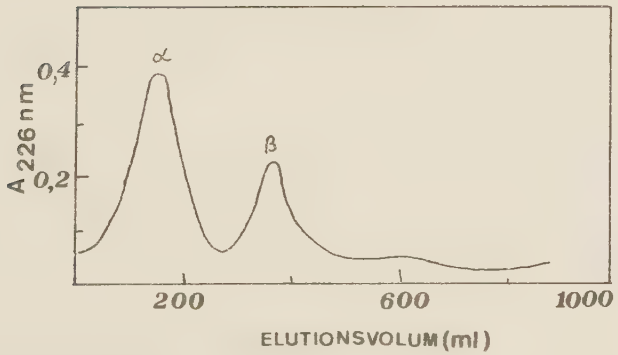


Abb. 45. Säulenchromatographische Trennung von denaturiertem pepsingelöstem Kollagen (K_6)

6.7. Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifuge ist eine nützliche Methode zur Reinheitsprüfung der Proteine . Mit dieser Methode ist es möglich , nicht nur das Molekulargewicht des Proteins zu bestimmen , sondern mann kann auch entscheiden , ob das untersuchte Protein bezüglich seines Molekulargewichtes einheitlich ist oder ein Gemisch von Komponenten verschiedener Molekulargewichte darstellt . Die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit liefert Informationen über das Molekulargewicht eines Proteins , seinen Reinheitsgrad und die Zusammensetzung eines Proteingemisches denn die verschiedenen Proteine setzen sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab .

In der vorliegenden Arbeit wurde für Sedimentationsversuche eine Ultrazentrifuge Beckmann Modell E verwendet . Ca. 1ml 0,5%ige Kollagenlösung in 0,1M Citrat-Puffer , pH 3,7 (Kollagen-Präparate K_2 u. K_6) wurde in die analytische Zelle der Ultrazentrifuge gebracht. Die Versuche wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 60000 rpm mit einer 1,2cm Normalzelle (A1) durchgeführt . Die Sedimentationsverläufe wurden in Intervallen von 480 Sec. photographisch registriert.

Da die Grundfläche der Zelle 5,7cm von dem Mittelpunkt der Rotation und r´cm von der Spitze der Bande bzw. der Grenze auf dem Sedimentationsdiagramm entfernt ist , ergeben sich aus den Platten folgende Ergebnisse (Tabelle 17) .

Es wurden die Lage (r) der einzelnen Peaks gemessen und logr gegen t (Sec) aufgetragen . Die Steigung (Abb. 47) wurde durch eine Ausgleichsrechnung bestimmt . Die Sedimentationskonstante läßt sich aus folgender Gleichung (109) rechnerisch ermitteln .

$$S = \frac{2,303}{w^2} \cdot \frac{\log r}{t}$$, wobei r = die Entfernung des Teilchens vom Rotationsmittelpunkt , w = die Winkelgeschwindigkeit der Zentrifuge, t = die Zeit des Zentrifugierens und S = die Sedimentationskonstante bedeuten . Aus der obengenannten Gleichung ergibt sich folgender

Tabelle 17 . Bestimmung der Sedimentationskonstante einer 0,5% igen Kollagenlösung bei 22^0C (Kollagen K_2)

Platte	r´(cm)	r = r´+ 5,7 (cm)	logr	t (sec.)
1	0,6881	6,3881	0,80537	0
2	0,7218	6,4218	0,80766	480
3	0,7532	6,4532	0,80978	960
4	0,7852	6,4852	0,81192	1440
5	0,8145	6,5145	0,81388	1920
6	0,8423	6,5423	0,81573	2400
7	0,8746	6,5746	0,81787	2880
8	0,9027	6,6027	0,81972	3360
9	0,9377	6,6377	0,82202	3840
10	0,9720	6,6672	0,82394	4320
11	0,9991	6,6991	0,82602	4800
12	1,0261	6,7261	0,82776	5280

Wert für die Sedimentationskonstante der α-Komponente eines säurelöslichen Placenta-Kollagen-Präparates (Präparat K_1) :

$$S = \frac{2,303}{(2\pi \frac{60000}{60})^2} \cdot \frac{\log r}{t} = 0,5834 \times 10^{-7} \times 4,23 \times 10^{-6}$$

$$= 2,47 \times 10^{-13} \text{ Sec.} = 2,47 \text{ S} .$$

Ähnlich gilt die Methode auch für die Bestimmung der Sedimentatonskonstante einer 0,5%igen pepsingelösten Kollagenlösung (Präparat K_6) . Die Werte für logr in Tabelle 18 wurden gegen t (Sec.) dargestellt und mit der Steigung logr / t (= $4,17 \times 10^{-6}$) , wurde die Sedimentationskonstante für pepsingelöste Kollagen zu $2,43 \times 10^{-13}$ Sec. = 2,43 Svedberg ermittelt .

Die ermittelten Werte für Placenta-Kollagene lagen etwas tiefer als die für Kalbshautkollagen gefundenen Werte (2,7 S) (60).

Die niedrigen Werte der Sedimentationskonstante für Placenta-Kollagene sind auf die niedrigeren Molekulargewichte der Placenta-Kollagene zurückzuführen , da die Sedimentationsgeschwindigkeit in erster Linie vom Gewicht des Teilchens in der betreffenden Lösung abhängt . Außerdem zeigte die Grenze auf dem Sedimentationsdiagramm (Abb. 46) eine heterogene Komponente (α und β) des Placenta-Kollagens an . Eine homogene Komponente besitzt einen größeren Werte der Sedimentationskonstanten .

Abb. 46. Sedimentationsdiagramm einer 0,5 %igen Kollagenlösung bei 22^0C .

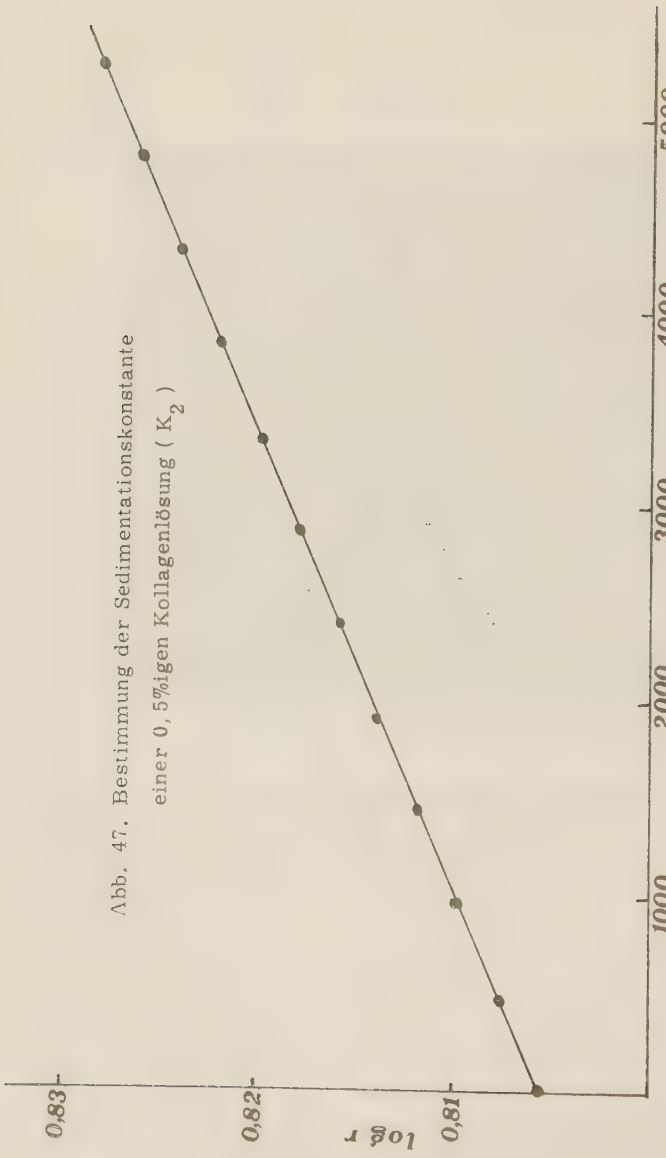


Abb. 47. Bestimmung der Sedimentationskonstante einer 0,5%igen Kollagenlösung (K_2)

Tabelle 18. Bestimmung der Sedimentationskonstante einer 0,5%igen pepsingelösten Kollagenlösung bei 22^0C.

Platte	r´ (cm)	r = r´ + 5,7 (cm)	logr	t (sec)
1	0,3740	6,0740	0,7834676	0
2	0,40145	6,10145	0,7854295	480
3	0,4245	6,1245	0,7870565	960
4	0,4513	6,1513	0,7890375	1440
5	0,4814	6,1814	0,7910868	1920
6	0,5087	6,2087	0,792200	2400
7	0,5300	6,2300	0,7944880	2880
8	0,5629	6,2629	0,7967755	3360
9	0,5930	6,2930	0,7988577	3840
10	0,62235	6,32235	0,800875	4320
11	0,64695	6,34695	0,8025617	4800
12	0,6780	6,3780	0,8046845	5280

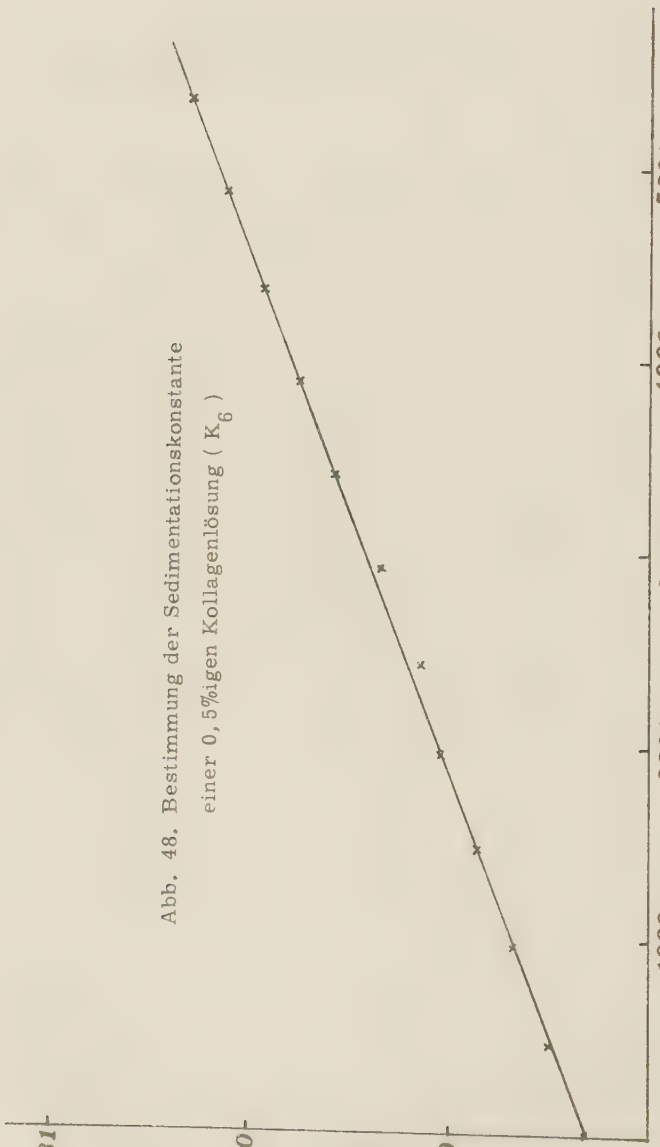


Abb. 48. Bestimmung der Sedimentationskonstante einer 0,5%igen Kollagenlösung (K_6)

7. ÜBER DEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN KOLLAGEN UND VITAMIN C IN HUMANPLACENTA

Die Angaben zur Beteiligung des Kollagens am Aufbau der Placenta in Abhängigkeit vom Alter beruhen ausschließlich auf histologischen Untersuchungen . Vitamin C konnten Tonutti u. Mitarb. (160) ebenfalls histologisch sowohl in den Stroma als auch in den Syncytiumzellen von Humanplacenten finden. Die heutige Vorstellung über den Einfluß der L-Ascorbinsäure auf die Synthese von Kollagen wurde von Jafferey u. Martin (67) entwickelt (Abb. 49). Der spezifische Angriffspunkt liegt zwischen dem Protokollagen (dem prolinreichen , hydroxyprolinfreien Kollagenvorläufer) und dem Tropokollagen . Ein Teil der Prolinmoleküle des Protokollagens wird unter Mitwirkung einer Prolinhydroxylase durch Sauerstoff in Gegenwart von Fe^{+2} -Ionen , Vitamin C und α-Ketoglutarat als Co-Faktoren zu Hydroxyprolinbausteinen oxydiert. Die grundlegende Reaktion , die durch Vitamin C aktiviert wird , ist eine aerobe, aliphatische Hydroxylierung nach der Gleichung (38) :

$$\text{Peptidyl-Prolin} + \text{L-Ascorbinsäure} + O_2 \xrightarrow[Fe^{2+}]{\alpha\text{-Ketoglutarat}} \text{Peptidyl-Hydroxyprolin} + \text{Dehydroascorbinsäure} + H_2O$$

In entsprechenderweise erfolgt in allerdings quantitativ geringerem Umfang die Bildung von Hydroxylysin aus Lysinresten des Protokollagens unter Mitwirkung von Lysinhydroxylase .

Die negative Wirkung des Vitamin C - Mangels in vivo auf die Kollagenbiosynthese ist unumstritten . Im Granulationsgewebe von künstlich nach 7 Tagen Vitamin C-freier Kost gesetzten Wunden wird beim Meerschweinchen kein Hydroxyprolin gebildet . In Analogie dazu fehlt das Kollagen in subkutanen Transplantaten von Polyvinylschwämmen bei Tieren mit Vitamin C -Mangel. Es entsteht aber sofort in überdurchnittlich großer Menge , wenn man direkt in den Schwamm L-Ascorbinsäure injiziert (4) .

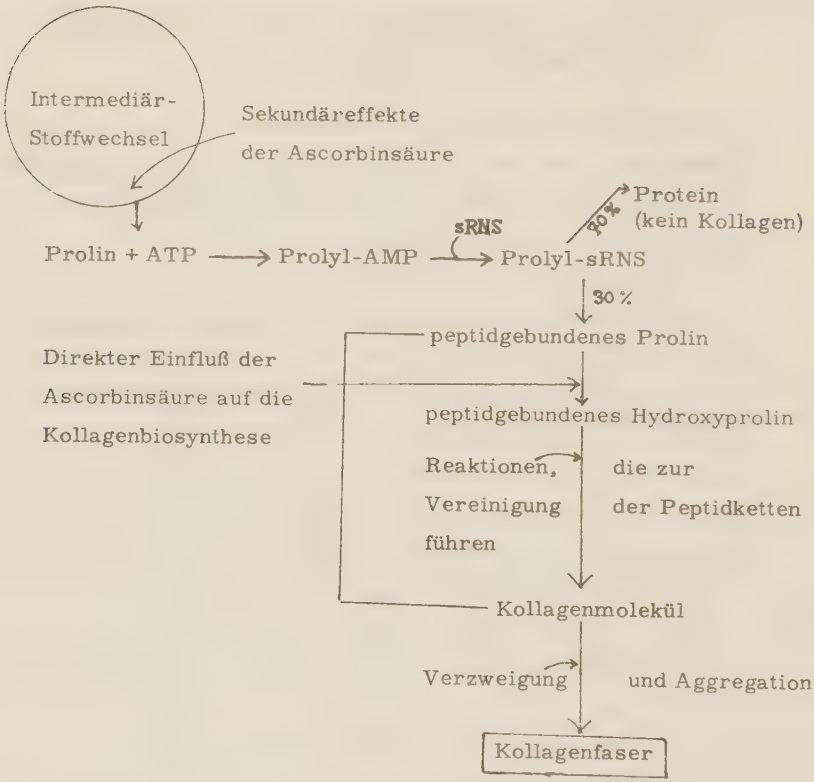


Abb. 49. Prolinhydroxylierung bei der Kollagenbiosynthese und der Angriffspunkt der Ascorbinsäure .

Nach dem heute als gesichert anzusehen ist , daß Vitamin C bei der Kollagenbiosynthese eine Rolle spielt , soll nachstehend dem Zusammenhang zwischen Kollagen- und Vitamin C-Gehalt menschlicher Placenten in Abhängigkeit vom Alter nachgegangen werden . In Humanplacenten definierten Alters wurden Gesamt-Vitamin C , L-Ascorbinsäure -und Kollagen-Gehalt zu verschiedenen Zeitpunkten der Gravität bestimmt. Unter Gesamt-Vitamin C verstehen wir, wie bereits erwähnt, die Summe

von L-Ascorbinsäure + Dehydroascorbinsäure , die ja beide biologisch aktiv sind .

7.1. Bestimmung von Kollagen in Placenta

Die Bestimmung des Hydroxyprolins und damit des Kollagengehaltes erfolgte , wie bereits erwähnt , mit Hilfe der Methode von Leach (81), Neumann u. Logan (108) und unter Berücksichtigung einiger in unserem Institut ausgearbeiteter Modifikationen (142) . Die Arbeitsvorschrift zur Bestimmung von Hydroxyprolin ist ,wie auf Seite **41** beschrieben. Die Placenta wurde mehrmals mit dest. Wasser gewaschen , mechanisch zerkleinert und gefriergetrocknet . Nach nochmaliger Zerkleinerung wurde sie 80 Stdn. im Thermostat bei 60^0C und schließlich im Exsikkator getrocknet . Die getrockneten Gewebe wurden dann zu Pulver verrieben . 10 mg des getrockneten pulvarisierten Materials hydrolysierten wir 24 Stdn . nach Zugabe von 1ml Wasser und 1ml 12N HCl bei 110^0C im zugeschmolzenen Rohr . Das Hydrolysat wurde im Rotationsverdampfer getrocknet und mit Wasser auf eine Konzentration gebracht ,die zwischen 5 bis 15 µg Hydroxyprolin /ml lag . Der Hydroxyprolingehalt der Analysenlösung wurde an Hand einer zur gleichen Zeit aufgenommenen Eichkurve mit bekannten Hydroxyprolingehalten ermittelt (vgl. S.**41**). Durch Multiplikation mit dem für Säugetiere geltenden Faktor 7,46 wurde der Kollagengehalt rechnerisch ermittelt .

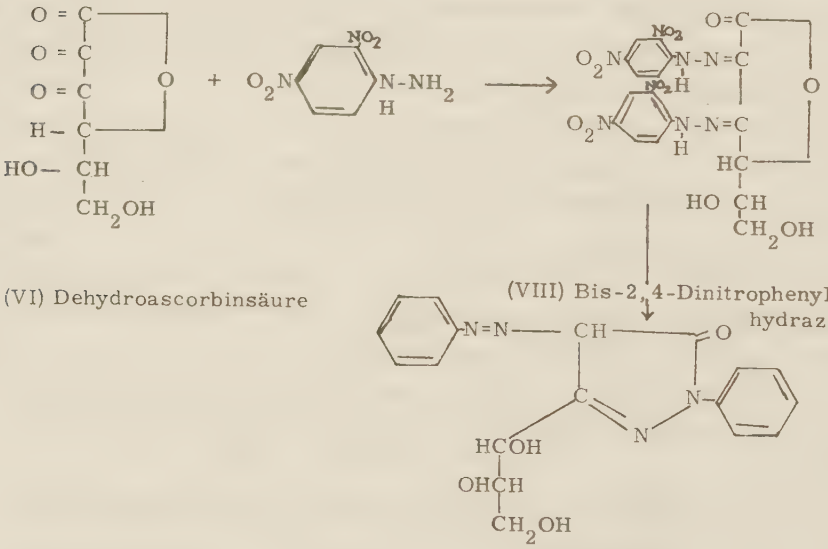
7.2. Bestimmung von Gesamt-Vitamin C und L-Ascorbinsäure in Humanplacenta

In der vorliegenden Arbeit wurde, abweichend von den in der Literatur vorgeschalgenen Methoden , der Gesamt-Vitamin C-Gehalt von menschlichen Placenten durch die von uns schon früher verwendete photometrische Methode mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ermittelt (140,173) : Methode I (DNPH-Methode).

Der L-Ascorbinsäure-Gehalt wurde durch die in ihrer Durchführung ebenfalls einfache photometrische Methode mit Phosphorwolframsäure bestimmt (39) : Methode II .

METHODE I :

a) Zur Methode : Die Dinitrophenylhydrazin-Methode (146) beruht auf der Oxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure (VI) bzw. 2,3-Diketogulonsäure , die mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin(DNPH) unter Bildung eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons (VIII) reagiert. Dieses Osazon löst sich in hochprozentiger H_2SO_4 mit roter Farbe.



(VI) Dehydroascorbinsäure

(VIII) Bis-2,4-Dinitrophenyl-hydrazon

(IX) 1-Phenyl-3-(L-threo-glyceryl-)-4-benzolazo-pyrazolon

(Umsetzung von Dehydroascorbinsäure mit 2,4-DNPH)

Die photometrisch bestimmte Intensität des Färbung entspricht der Vitamin C-Konzentration in der Lösung . Ein Vorteil der photometrischen Methode mit DNPH gegenüber der oxydimetrischen Titration ist die Tatsache , daß sie auf verhältnismäßig einfache Weise die Erfassung des Gesamt-Vitamin C gestattet . Die Empfindlichkeit der Methode ist ausreichend .

b) Reagenzien : Für alle wäßrigen Lösungen ist destilliertes Wasser, frisch aufgekocht und wieder erkaltet zu verwenden .

1) Dinitrophenylhydrazin-Lösung (2%) : in einem Erlenmeyerkolben legt man 80ml Wasser vor , läßt langsam 27ml konz. H_2SO_4 (Dichte 1,84) einfließen und mischt . In der noch warmen Lösung löst man 2g 2,4-Dinitro-phenylhydrazin , danach läßt man erkalten und filtriert wenn nötig .

2) Metaphosphorsäure-Lösung 10% : 2oog HPO_3 werden in 1800ml Wasser kalt gelöst und die Lösung wenn nötig filtriert.

3) Brom : rein

4) Thioharnstoff : krist. rein

5) Thioharnstoff-Lösung (1%) : 2g Thioharnstoff werden in 200ml HPO_3 (5%) gelöst.

6) Schwefelsäure etwa 85% : 170ml konz. H_2SO_4 (98%) werden vorsichtig unter Kühlung und öfterem Umrühren in 26ml Wasser eingetragen.

7) L-Ascorbinsäure-Standard-Lösung (vor Gebrauch frisch zubereiten): 50mg L-(+) Ascorbinsäure krist. werden in 5%iger HPO_3 gelöst und auf 50ml aufgefüllt . 10ml dieser Lösung wird mit 5%iger Metaphosphorsäure auf 1oo ml verdünnt .

Arbeitsvorschrift :

c) Herstellung der Eichkurve : Die Standardlösung mit 0,1mg Ascorbinsäure pro ml (b,7) wird zu gleichen Teilen auf zwei verschließbare Gefäße verteilt . Die Lösungen werden nacheinander im Abzug durch Zugabe kleinster Tropfen Brom (b,3) aus einer Kapillare und Schütteln oxydiert. Der Bromüberschuß am Ende der Oxydation darf nur gering und die

Lösung nur ganz schwach gelb gefärbt sein . Sollten noch Bromtröpfen am Boden des Gefäßes vorhanden sein , so wird die überstehende Lösung in einen Meßzylinder dekantiert , der Bromüberschuß durch kurzes Einleiten von Stickstoff entfernt und die letzten Spuren durch Zugabe einer kleinen Spatelspitze Thioharnstoffkristall (b , 4) reduziert.
Von beiden Lösungen stellt man eine Verdünnungsreihe wie folgt hier:

Milliliter oxydierte Standard-Lösung	Milliliter Thioharnstoff-Lösung 1% (b, 5)	Erhaltene Konzentration in µg/ml
1	24	4
2	23	8
3	22	12
4	21	16

Von jeder Konzentration aus den beiden Verdünnungsreihen pipettiert man 5ml in ein Reagensglas , versetzt mit 1ml Dinitro-phenyl-Hydrazin-Lösung (b, 1) , mischt und erwärmt genau 3 Stdn. in einem Wasserbad von 38^0C . Nach dieser Zeit werden die Gläser 10 Min. in ein Eisbad gestellt . Zur Herstellung der Blindwerte werden 5ml von jeder Konzentration einer Verdünnungsreihe mit 1ml Dinitrophenyl-Hydrazin-Reagens (b, 1) versetzt und ebenfalls in Eiswasser gekühlt. Nun gibt man langsam , tropfenweise 5ml 85%ige H_2SO_4 (b, 6) (aus einer Bürette) in jedes Reagensglas und mischt gleichzeitig mit einem Glasstab.
Nun werden die Gläser aus dem Eisbad genommen und 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen . Man photometriert bei 520-530mµ gegen die zugehörige Blindwertlösung .
d) Extinktionsmessungen : Die Extinktionen der Lösung im Absorptionsmaximum 520-522 mµ werden gegen die Reagensblindlösung gemessen. Die Extinktionen werden gegen die entsprechenden Ascorbinsäurekonzentration pro ml Meßlösung aufgetragen : Abb. 50.

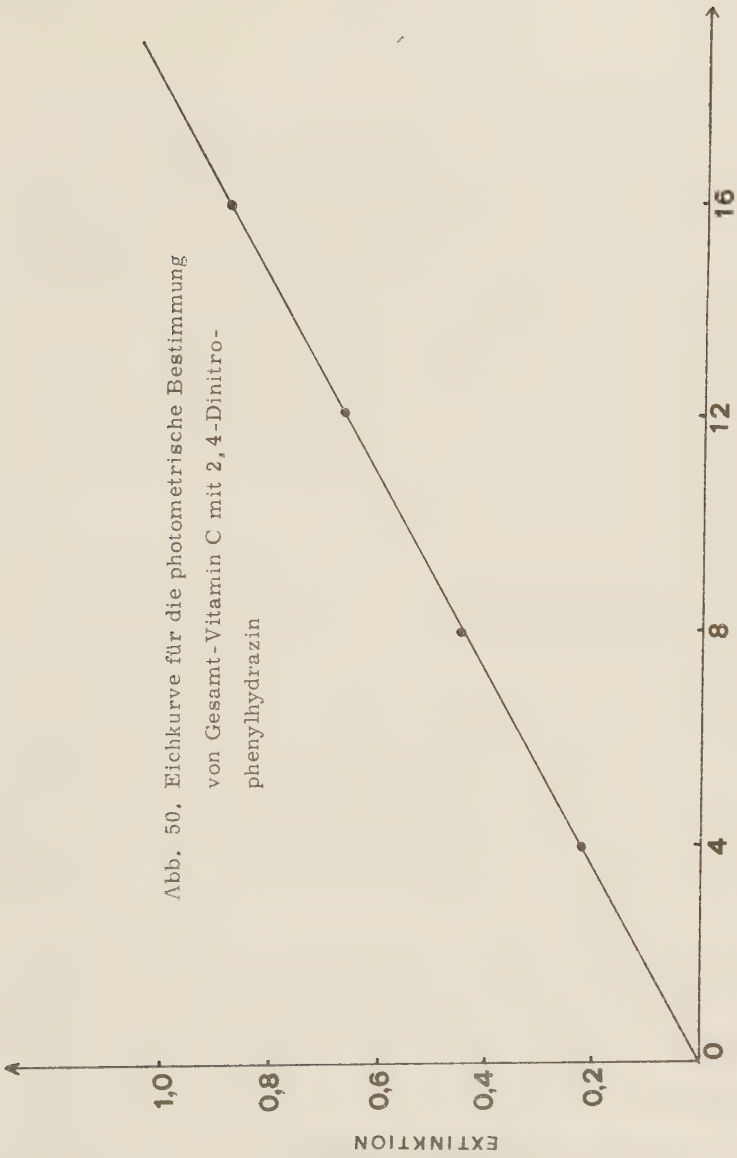


Abb. 50. Eichkurve für die photometrische Bestimmung von Gesamt-Vitamin C mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

e) Vorbehandlung und Analyse der Placenta :

Vorbehandlung des Untersuchungmaterials : 20g mit dest. Wasser gewaschene, mechanisch zerkleinerte , gefriergetrocknete Placentagewebe wurden in einem elektrischen Mixgerät mit Schneidemessern nach Zugabe eines gleichen Gewichtes (20g) 10%iger Metaphosphorsäure sowie nach Überleiten von CO_2 homogenisiert. 2og des Homogenats werden in Meßkolben mit 5% iger Metaphosphorsäure auf 100ml aufgefüllt . Durch Zugabe kleinster Tropfen Brom aus einer Kapillare wird die Lösung unter Schütteln oxydiert . Der Bromüberschuß am Ende der Oxydation darf nur gering und die Lösung nur ganz schwach gelb gefärbt sein . Nach Hinzufügen von 1g Thioharnstoff wird filtriert.

Analyse der Probelösung : 5ml der Probe werden mit 20ml 1%iger Thioharnstoff-Lösung verdünnt . Aus dieser verdünnten Lösung pipettiert man 5ml in ein Reagensglas , versetzt mit 1ml Dinitro-phenylhydrazin - Lösung , mischt und erwärmt genau 3Stdn. in einem Wasserbad von 38^0. Nach dieser Zeit wird das Reagensglas 10Min. in ein Eisbad gestellt. Zur Herstellung der Blindwerte werden 5ml von der verdünnten Lösung mit 1ml DNPH-Lösung versetzt und ebenfalls in Eiswasser gekühlt. Nun werden langsam , tropfenweise 5ml 85%ige H_2SO_4 in die Reagensgläser gegeben , unter Umrühren mit einem Glasstab . Dann werden die Gläser aus dem Eisbad genommen und 30 Min. bei Zimmertemp. stehen gelassen .

Die Extinktionen der Probe werden in einem geeigneten Photometer im Absorptionsmaximum 520-522 mμ gegen die zugehörige Blindwertlösung gemessen .

Auswertung :

Die den Extinktionswerten der Probelösung entsprechenden Gesamt-Vitamin C-Mengen werden einer Eichkurve (Abb. 50) entnommen , die unter den gleichen Bedingungen von Lösungen bekannten Vitamin C-Gehaltes aufgenommen worden ist .

METHODE II :

Zur Methode

Die Methode beruht auf der Beobachtung , daß Folins-Reagens in Anwesenheit von Jodessigsäure bei pH 3 verhältnismäßig selektiv von Ascorbinsäure reduziert wird . Durch pH-Einstellung wird auch der Einfluß einer Reihe störender Substanzen ausgeschaltet, die unter anderen Bedingungen das Folins-Reagens reduzieren . Durch die angeführte Reaktion entsteht eine sehr gut meßbare , verhältnismäßig beständige Blaufärbung , die zur photometrischen Bestimmung verwandt wird .

Reagenzien

1. Metaphosphorsäure, 5%ig .
2. Phosphatpuffer (pH 6,2) : 8,17g primäres Kaliumphosphat und 6,97g Sekundäres Kaliumphosphat werden in Wasser gelöst und auf 100ml aufgefüllt .
3. Jodessigsäure ,1M : 18,6g Jodessigsäure werden in einer kleinen Wassermenge gelöst das asusgeschiedene freie Jod mit etwas Natriumthiosulfat beseitigt und auf 100ml aufgefüllt.
4. Folins-Reagens : 17,7g kristallines, wasserfreies Natriumwolframat werden in einem Gemisch von 6,5ml 85% iger Orthophosphorsäure und 30ml Wasser gelöst . Die Lösung wird am Rückflußkühler (zunächst vorsichtig mit kleiner Flamme) erhitzt , dann abgekühlt und eine kleine Menge Bromwasser zugesetzt , so daß die durch Brom verursachte Färbung deutlich erkennbar ist . Man rührt gründlich durch und vertreibt nach dem Erwärmen das überschüssige Brom durch Einleiten von Stickstoff . Nach dem Abkühlen wird mit Wasser auf 100ml aufgefüllt. Die Lösung ist leicht gelb gefärbt und klar .

Ausführung :

Zu 4g der gewaschenen , gefriergetrockneten und zerkleinerten Placentagewebe wurden 8ml 5%ige Metaphosphorsäure und 8ml dest. Wasser zugesetzt . homogenisiert und danach bei 4000 U/Min. zentrifugiert . Die überstehende Flüssigkeit wurde abfiltriert . Zu 4ml des Filtrats wurden 2ml Phosphatpuffer, pH 6,2 und 1ml 1M Jodessigsäure gegeben und die Mischung im Wasserbad (40 ^{0}) 5 Min. erhitzt. Nach Zugabe von 1ml Folins-Reagens wurde das Reaktionsgemisch weiter 10 Min. auf 40^{0}C erwärmt , in kaltem Wasser abgekühlt und schließlich die Extinktion bei 722nm gegen einen Blindansatz gemessen .

Der Ascorbinsäuregehalt (Xmg pro 100g Placentagewebe) wird auf Grund der Formel berechnet :

$X = 8,13.E.v.$, wobei bedeuten :

E = Extinktion der Probe , v = die Verdünnung.

Ergebnisse :

Die Meßergebnisse sind in Tab. 20 zusammengefaßt und in Abb. 51 u. 52 graphisch dargestellt . Sie zeigen , daß Kollagen , Gesamt-Vitamin C - und L-Ascorbinsäure-Gehalt in Laufe der Schwangerschaft , und zwar in der Zeit von 27 bis 40 Wochen , zunehmen . Placenten eines Alters unter 27 Wochen haben uns nicht zur Verfügung gestanden . Die Resultate stützen den oben aufgezeichneten Zusammenhang zwischen Vitamin C und Kollagen bei der Biosynthese dieses Eiweißkörpers.

Im Gegensatz zu den Angaben der Literatur wurden bei Placenten sich entsprechenden Alters keine sehr großen Schwankungen der Vitamin C-Werte festgestellt : Tab. 20 : zu vergleichen mit den Werten 4,0 -40 ,0 mg% der Literatur (S.15).

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse wurde die statistische Auswertung nach Fragner (35) durchgeführt .

Die Streuung der Kollagenbestimmungen ist durch eine Standardabweichung von etwa 4% charakterisiert (Tab. 19) , die Streuung der Gesamt-Vitamin C- Werte durch einen entsprechenden Werte von 3,85 % . Ein Beispiel für die statistische Auswertung von Ergebnissen der Kollagenanalysen enthält Tabelle 19 .

Tabelle 19. Statistische Auswertung von Kollagenanalysen in Humanplacenten .

Bestimmung	Kollagen (%)	d	d^2
1	19,25	+0,10	0,0100
2	18,23	-1,12	1,2544
3	20,20	+0,85	0,7225
4	19,12	-0,23	0,0529
5	19,95	+0,60	0,3600
	96,75		2,3998

$\bar{x}$ = 19,35 % ,

$S_x = \sqrt{\frac{2,3998}{4}}$ = 0,775 % ; entspricht 4% des Resultates .

Tabelle 20. Kollagen-, Gesamt-Vitamin C - und L-Ascorbinsäure— Gehalt von Humanplacenten in Abhängigkeit vom Alter

Alter der Placenta in Wochen	Kollagen (%)	Gesamt-Vitamin C (mg%)	L-Ascorbinsäure (mg%)
40	19,25	20,05	19,21
40	18,70	18,35	18,06
40	19,12	19,00	17,95
40	18,53	20,00	17,08
40	18,23	21,07	20,25
38	17,77	17,56	17,31
38	17,64	16,48	16,00
36	16,30	15,45	14,02
36	16,08	14,91	-
34	14,90	14,05	13,71
30	13,56	12,00	11,05
30	12,53	11,09	-
27	11,19	10,23	8,75
27	10,60	9,80	-

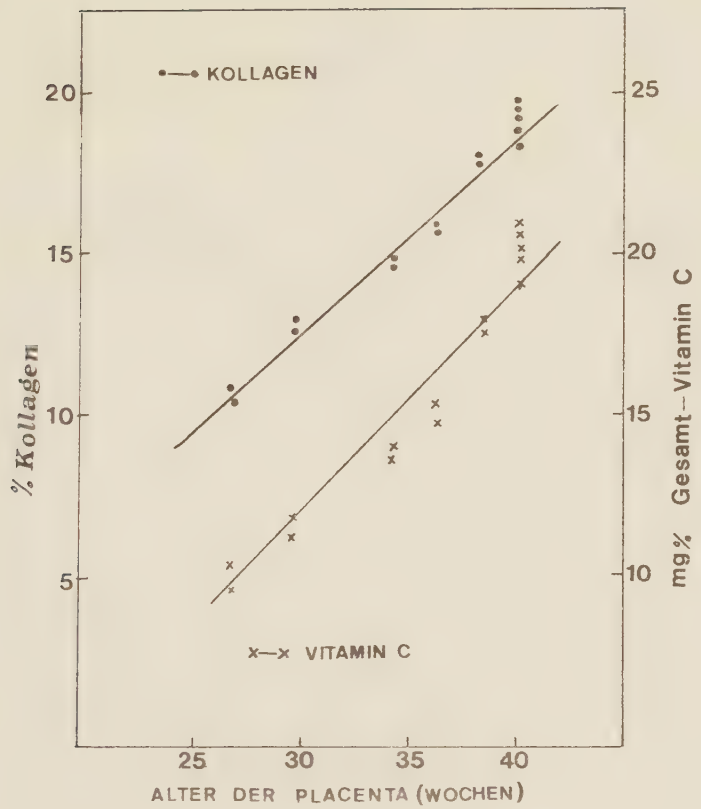


Abb. 51. Kollagen - und Gesamt-Vitamin C- Gehalt von Humanplacenten in Abhängigkeit vom Alter

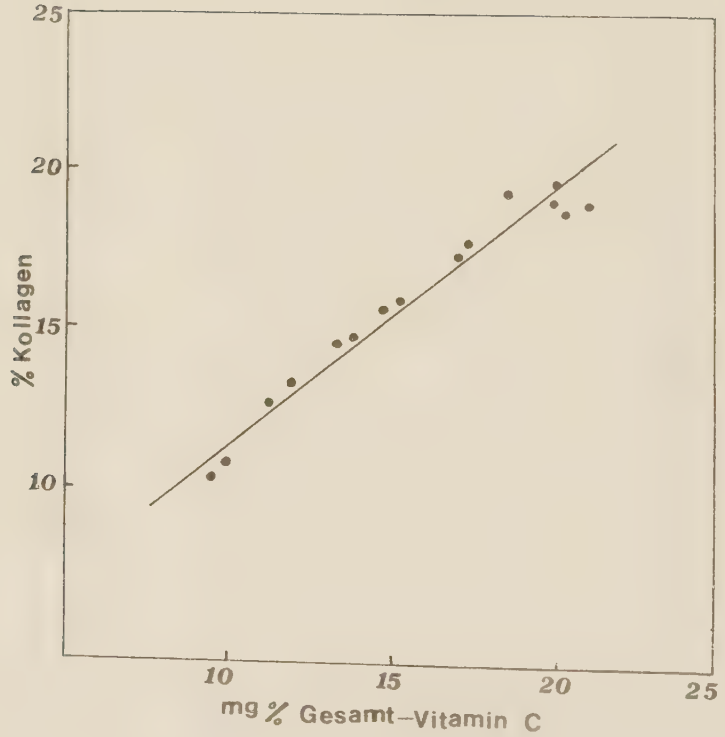


Abb. 52. Linearer Anstieg des Kollagen - und Gesamt-Vitamin C- Gehaltes von Humanplacenten (Abb. 51).

8. PRÄPARATIVE ARBEITSVORSCHRIFTEN

Es wurden mehr als 20 Präparate aus Rinderplacenten zur Untersuchung der Chemie und Eigenschaften von löslichen Kollagenen hergestellt . Die Einwirkung von Bakterien während der Extraktion wurde durch Zusatz von Toluol verhütet .

Kollagen-Präparat Nr.K_1 (Säurelösliches Kollagen) :

500g vorbehandelte Rinderplacenten wurden 24 Std. mit 0,2M NaCl bei 3-4 °C extrahiert und die Rückstände sorgfälltig mit destilliertem Wasser gewaschen und gefriergetrocknet .

Extraktion : 400g gefriergetrocknete Placentarückstände wurden dann dreimal mit der vierfachen Menge 0,1M CH_3COOH vom pH 2,9 , bei 3-4°C für 48 Stdn. extrahiert . Danach wurde die Lösung bei 20000xg, eine Std. lang zentrifugiert .

Aussalzen : 4l klare Kollagenlösung wurden langsam unter Rühren mit festem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 7 Gew% versetzt und 24 Std. bei 4°C stehen gelassen . Das ausgefällte Protein wurde dann abzentrifugiert (50 Min. bei 10000xg) , das Rohkollagen zweimal mit Wasser gewaschen , wieder in 500ml 0,1M CH_3COOH gelöst und gegebenfalls ein zweites Mal in entsprechender Weise ausgefällt.

Dialyse : Das ausgefällte Rohkollagen wurde mit 100ml Wasser aufgeschlämmt und 72 Std. lang bei mehrmaligem Vorlagenwechsel gegen dest. H_2O unter Rühren dialysiert . Der in der salzfreien Lösung während der Dialyse ausgefallene Anteil wurde bei 40000 x g , 30 Min. abzentrifugiert und zweimal mit bidest. Wasser gewaschen .

Gefriertrocknen : Das mit Wasser ausgewaschene Kollagen wurde dann 30 Stdn. gefriergetrocknet (Leybold-Heraeus GT 2) : Rohkollagen K_1.

(vgl. auch Schema 53 . Weitere Reinigung ist auf der Seite **147**).

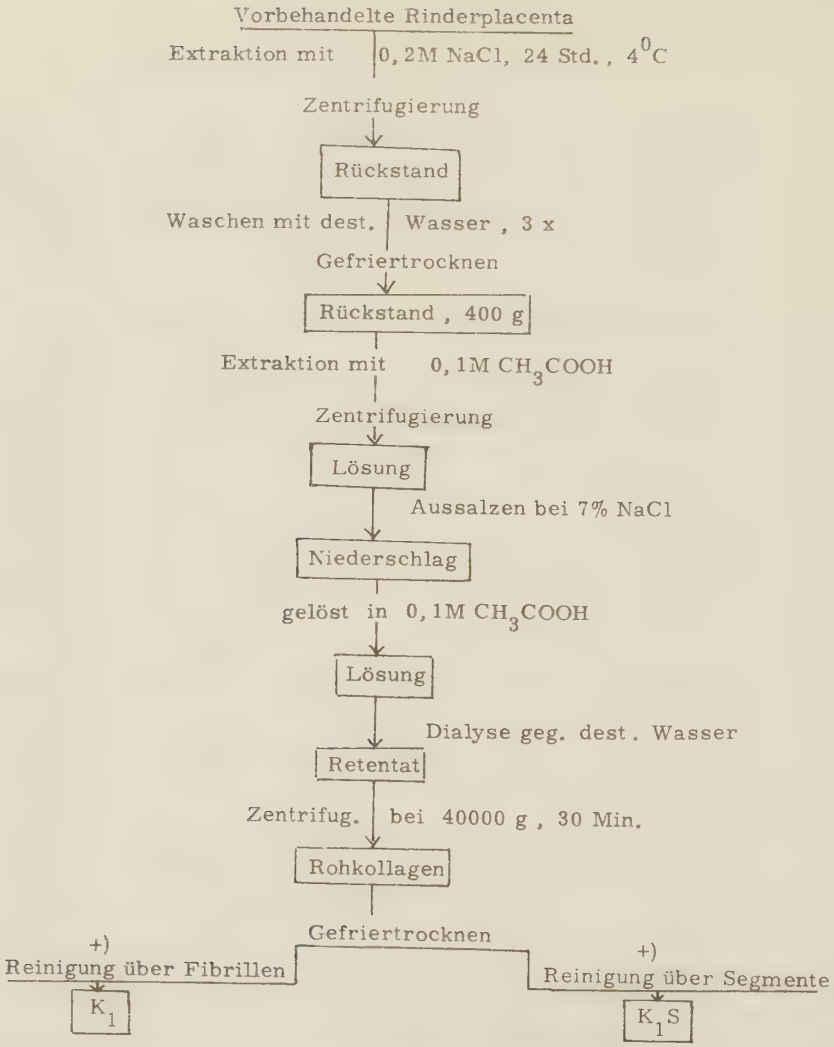


Abb. 53. Aufarbeitungsschema zur Herstellung von säurelöslichem Placenta - Kollagen (K_1)

+) Reinigungsoperation befindet sich zum Schluß des Kapitels (S.147)

Kollagen-Präparat Nr. K_2 (Säurelösliches Kollagen) :

500g vorbehandelte Rinderplacenten wurden zweimal mit 21 0,5M Natriumacetat behandelt . Nach sorgfälltigem Waschen mit dest. Wasser wurden die so vorgereinigten Rückstände zweimal mit 21 0,1M Citrat-Puffer , pH 3,7 48 Stdn. lang bei 4°C unter Umrühren extrahiert . Nach Zentrifugieren bei 20000 x g , eine Std. , erfolgte Dialyse der Lösung gegen 0,02M Na_2HPO_4 (3 Tage) . Das abgeschiedene Rohkollagen wurde dann bei 20000 x g , 30 Min, abzentrifugiert, dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und in 500ml 0,1M Citrat-Puffer gelöst . Die Lösung wurde dann wieder 40 Std. bei 4°C gegen o,02M Na_2HPO_4 dialysiert und das ausgeschiedene Kollagen bei 40000 x g, 20 Min., zentrifugiert . Das Rohkollagen wurde danach in 400ml 0,1M Essigsäure gelöst und durch Dialyse gegen dest. Wasser Fibrillen des nativen Typs ausgefällt , mit bidest. H_2O gewaschen und gefriergetrocknet : Rohkollagen K_2 .

Kollagen-Präparat Nr. K_3 u. K_4 (Neutralsazlösliches - und säurelösliches Kollagen) :

500g vorbehandelte Placenten wurden nach Vorwaschen mit dest. Wasser dreimal mit der fünffachen Menge 0,5M NaCl-Lösung (pH 7,5) 24 Stdn. lang unter Umrühren bei 4°C extrahiert . Nach der Extraktion wurde das Homogenat 50 Min. bei 2200 x g zentrifugiert . Die Rückstände wurden zur Isolierung von säurelöslichem Kollagen weiter bearbeitet (Schema 54) .

Die NaCl-Kollagen-Lösung wurde filtriert und 1 Stunde bei 2200x g zentrifugiert . Dann wurde das neutralsalzlösliche Kollagen durch Zugabe von NaCl in Mengen bis zu 20% ausgefällt und zwei Stdn. stehen gelassen . Der Niederschlag wurde nach Zentrifugieren (12000 x g, 40 Min.) in 5oo ml 0,1M CH_3COOH gelöst . Nach Zentrifugieren bei 2000 x g , 30 Min. wurde die Kollagen-Lösung gegen 0,5M NaCl-Lösung

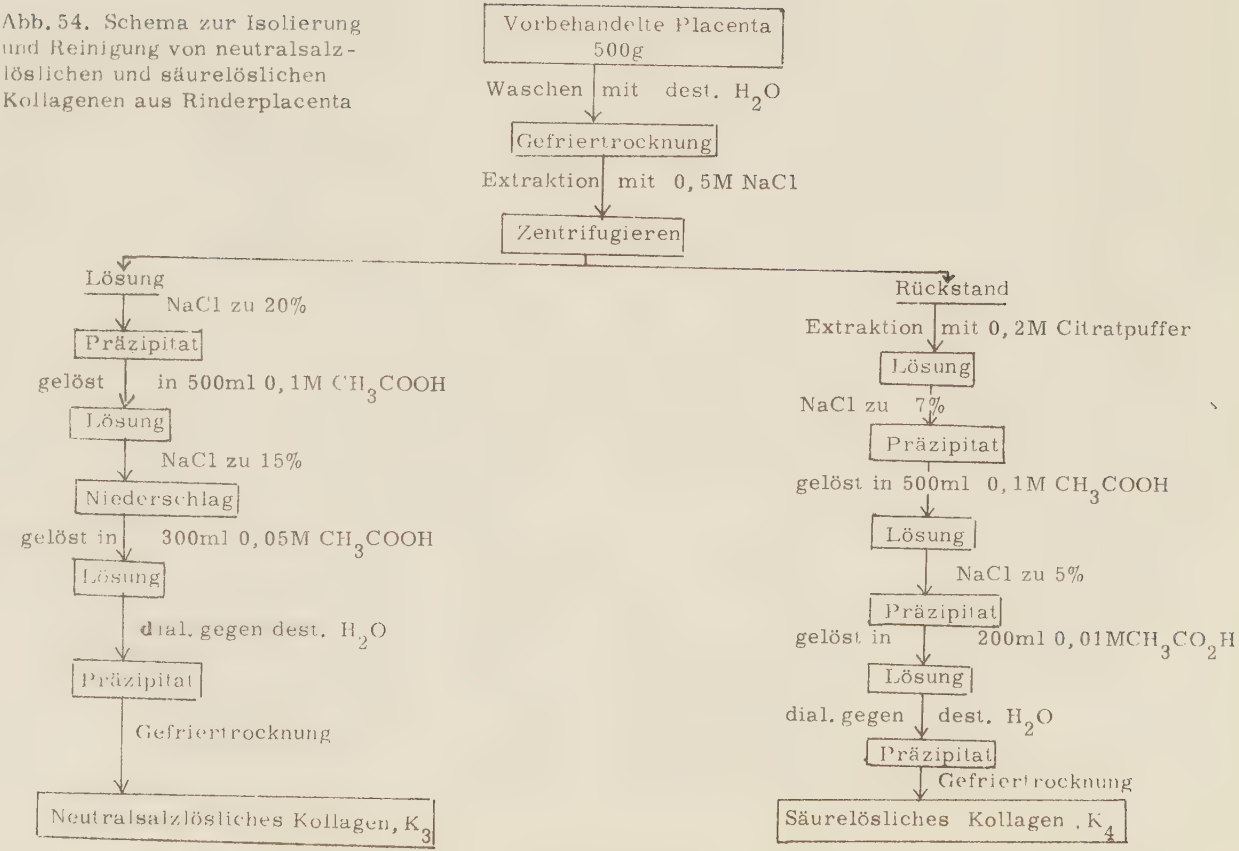
dialysiert . Nach Zugabe von NaCl bis zu 15% wurde das Kollagen erneut ausgefällt und in 3ooml 0,05M CH_3COOH gelöst . Nach Zentrifugieren (20000 x g, 30 Min.) wurde die Lösung eine Woche lang gegen dest. Wasser dialysiert , das ausgeschiedene Kollagen abzentrifugiert , dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und schließlich gefriergetrocknet : Rohkollagen K_3.

Zur Isolierung von säurelöslichem Kollagen wurden die nach der Extraktion mit 0,5M NaCl-Lösung erhaltenen Rückstände dreimal mit fünffacher Menge 0,2M Citrat-Puffer vom pH 3,5 , unter Rühren bei 4^oC, 24 Stdn. extrahiert . Die durch 30 Min. bei 2200 x g , Zentrifugierung des Homogenats erhaltene Lösung wurde filtriert und wieder bei 20000 x g, 40 Min, zentrifugiert . Durch Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 7 % wurde das Rohkollagen ausgefällt . Nach Zentrifugieren wurde das Präzipitat in 500ml 0,1M Essigsäure gelöst und die Lösung 5o Min. bei 20000 x g , wieder zentrifugiert . Nach Zugabe von festem NaCl zu 7 % wurde das Präzipitat abzentrifugiert und in 200 ml 0,01M Essigsäure wieder gelöst . Die Lösung wurde dann eine Woche gegen dest. Wasser dialysiert . Das ausgeschiedene Kollagen wurde dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend gevriergetrocknet : Rohkollagen K_4 .

Kollagen- Präparat Nr.K_5 (Neutralsalzlösliches Kollagen) :

500g vorbehandelte Placenten wurden nach Vorwaschen mit dest. Wasser dreimal mit der zehnfachen Menge 0,2M NaCl-Lösung,pH 7,4 , 48 Std. lang bei 4^oC unter Rühren extrahiert . Das Homogenat wurde bei 2000xg, 1 Std. , zentrifugiert . Die erhaltene Lösung wurde durch eine Nesseltuchschicht vorfiltriert und bei 20000 x g. , 30 Min. , zentrifugiert . Nach Zugabe vom NaCl zu einer Konzentration bis 20% wurde das Rohkollagen ausgefällt und durch Zentrifugieren bei 1200 x g , 30 Min., von der Lösung getrennt . Der Niederschlag wurde in 500ml 0,2M NaCl ,

Abb. 54. Schema zur Isolierung und Reinigung von neutralsalzlöslichen und säurelöslichen Kollagenen aus Rinderplacenta



gepuffert vom pH 7,4 , gelöst und dann bei 20000 x g , 1 Std., klar zentrifugiert. Nach Zugabe von festem NaCl zu einer Endkonzentration von 5M wurde das Kollagen erneut ausgefällt und abzentrifugiert. Das Kollagen wurde dann in 300ml 0,01M Essigsäure gelöst und gegen das gleiche Lösungsmittel eine Woche lang dialysiert . Das ausgeschiedene dialysierte Kollagen wurde dann mit bidest. Wasser mehrmals gewaschen und gefriergetrocknet : Rohkollagen K_5 .

Kollagen-Präparat Nr. K_6 (Pepsingelöstes Kollagen) :

400g vorbehandelte Placenten wurden zunächst mit dest. Wasser dreimal gewaschen und danach gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Placenten wurden mit 5-facher Menge 0,1M Citrat-Puffer vom pH 3,7 dreimal bei 4°C unter Rühren extrahiert , das ungelöste Material bei 2200 x g , 1 Std., abzentrifugiert (vgl. Schema der Abb. 55). Der nach dreimaliger Citratextraktion verbleibende Rückstand wurde dann mit Pepsin (Kollagen : Enzym = 25 : 1) in fünffacher Menge 0,1M Essigsäure bei 24°C , 20 Std. unter gelegentlichen Aufwirbeln inkubiert. Das Homogenat wurde dann bei 2000 x g , 50 Min ., bei 4°C zentrifugiert . Nach Filtrieren durch eine Nesseltuchschicht wurde die Lösung klar zentrifugiert (40000 x g , 1 Std.) . Das Kollagen wurde durch Dialyse gegen 0,02M Na_2HPO_4 abgeschieden und nach Zentrifugieren (20000 x g , 30 Min.) in 300ml 0,1M CH_3COOH gelöst . Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Das abgeschiedene Kollagen wurde dann bei 15000 x g , 1 Std ., abzentrifugiert , mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet : Rohkollagen K_6 .

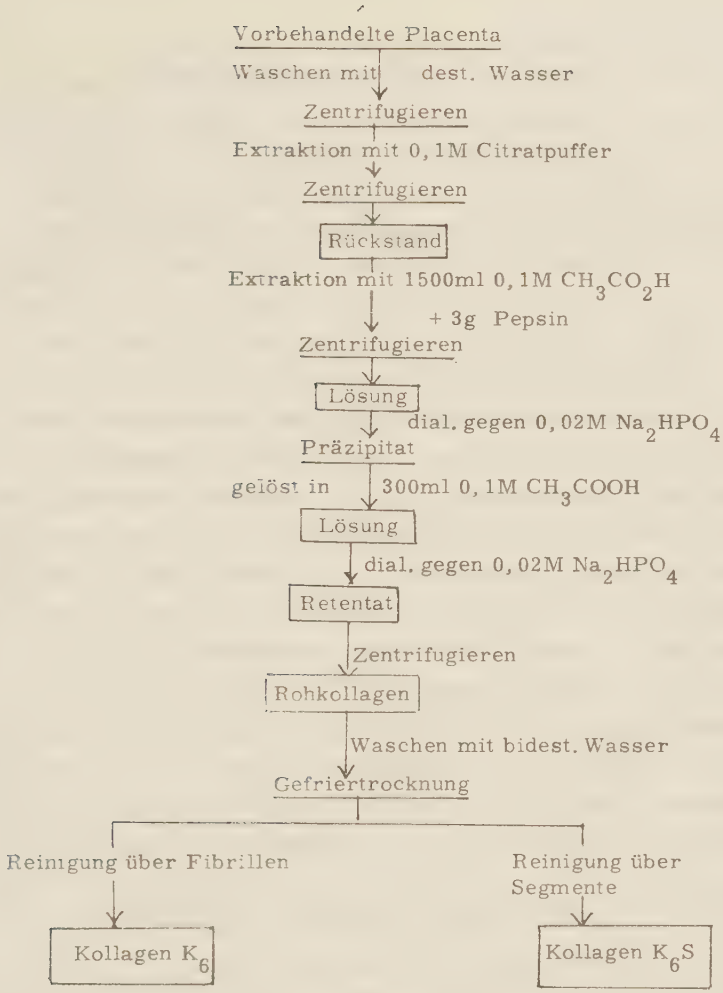


Abb. 55. Aufarbeitungsschema zur Isolierung und Reinigung von pepsingelöstem Kollagen aus Rinderplacenten

Kollagen-Präparat Nr. K_7 (Pepsingelöstes Kollagen) :

500g vorbehandelte Placenta wurde mit 2l 0,1M NaOH 24 Std. lang bei 4°C behandelt . Der ungelöste Rückstand wurde dann mit dest. Wasser mehrmals gewaschen und gefriergetrocknet. Die so vorbehandelten Rückstände (400g) wurden dann mit 4g Pepsin (Kollagen : Enzym = 20 : 1) in 2000ml 0,5M Essigsäure 20 Std. bei 20 °C unter Umrühren inkubiert . Das Homogenat wurde bei 4°C zentrifugiert (2000 x g , 1 Std.) . Nach Filtrieren wurde die Lösung bei 40000 x g , 1 Std., wieder zentrifugiert . Das Kollagen wurde dann durch Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 0,9M ausgefällt und 4 Stdn. lang bei 4°C stehengelassen . Das Kollagen wurde bei 20000 x g, 4o Min. abzentrifugiert . Pepsin wurde durch Auflösung des Kollagens in 1,0M NaCl/o,05M Tris/HCl , pH 7,5 inaktiviert . Nach drei Tagen wurde die Lösung gegen 0,02M Na_2HPO_4 vom pH 9,4 dialysiert. Das abgeschiedene Kollagen wurde bei 20000 x g , 1 Std. , abzentrifugiert und in 500ml 0,1M CH_3COOH gelöst . Nach Zentrifugieren wurde die Lösung 3 Tage lang gegen mehrmals gewechselte 0,02M Na_2HPO_4-Lösung dialysiert . Das ausgefallene Kollagen wurde bei 40000 x g , 1 Std., zentrifugiert , mehrmals mit bidest. H_2O gewaschen und danach gefriergetrocknet : Rohkollagen K_7 .

Kollagen-Präparat Nr. K_8 (Pepsingelöstes Kollagen) :

500g vorbehandelte Placenta wurde nach Waschen mit dest. Wasser in 1M NaCl , 24 Std. bei 4°C extrahiert . Nach Zentrifugieren (2200 xg, 40 Min.) wurden die Rückstände gefriergetrocknet und durch Zusatz von Pepsin (Kollagen : Enzym = 20 : 1) in 3l 0,5M Ameisensäure unter Umrühren 24 Stdn. lang bei 3-4°C extrahiert . Das Homogenat wurde dann bei 2000 x g , 50 Min., zentrifugiert. Das Kollagen von der Lösung wurde durch Dialysieren gegen 15% KCl in 0,02M Na_2HPO_4 ausgefällt . Nach Zentrifugieren wurde das ausgefallene Kollagen in

400ml 0,1% CH_3COOH gelöst . Durch Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 1M wurde das Kollagen wieder ausgefällt . Nach Zentrifugieren bei 40000 x g , 50 Min., wurde das Präzipitat in 300ml 0,1M CH_3COOH gelöst und gegen 15% KCl in 0,02M Na_2HPO_4 3 Tage lang dialysiert . Nach Zentrifugieren wurde das Rohkollagen mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet: Rohkollagen K_8 .

Kollagen-Präparat Nr. K_9, K_{10} und K_{11} :

Vorextraktion : 200g mit dest. Wasser gewaschene , gefriergetrocknete vorbehandelte Placenten wurden zuerst 24 Std. mit 11 0,1M NaCl-Lösung extrahiert . Nach dem Zentrifugieren wurde der Rückstand(I) nachfolgend behandelt .

Kollagen K_9 (Säurelösliches Kollagen) : Die Rückstände I nach der NaCl-Extraktion wurden in 11 0,1M CH_3COOH unter Zusatz von 300g Harnstoff und 10g Ascorbinsäure 48 Std. bei 4°C unter Umrühren extrahiert . Das Homogenat wurde dann bei 2000 x g , 50 Min., zentrifugiert . Nach Filtrieren durch eine Nesseltuchschicht wurde die Lösung bei 20000 x g, 30 Min., ultrazentrifugiert . Durch Zugabe von festem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 7% wurde das Kollagen ausgefällt . Das Präzipitat wurde dann in 700ml 0,1M CH_3COOH gelöst und abzentrifugiert . Die Lösung wurde ca. eine Woche lang gegen dest. Wasser dialysiert . Das abgeschiedene Kollagen wurde dann abzentrifugiert und wieder in 500ml 0,1M Citratpuffer , pH 3,7 , gelöst . Nach Zentrifugieren wurde die Lösung gegen dest. H_2O dialysiert und schließlich gefriergetrocknet : Rohkollagen K_9.

Kollagen K_{10} (Säurelösliches Kollagen) : Die Rückstände II nach der Essigsäure-Extraktion wurden in 800ml 0,15M CH_3COOH unter Zusatz von 80g Äthylurethan 24 Std. lang unter ständigem Rühren extrahiert und danach 50 Min. bei 2000 x g zentrifugiert . Die Lösung wurde nach Filtrieren bei 20000 x g, 50 Min. nochmals zentrifugiert . Nach Zugabe

von festem NaCl zu einer Endkonzentration von 5% wurde die Lösung bei 4°C über Nacht stehengelassen . Das Präzipitat wurde nach Zentrifugieren bei 2000 x g , 40 Min., in1000ml 0,1M Essigsäure gelöst und wieder zentrifugiert . Die Lösung wurde dann ca. 5 Tage gegen dest. Wasser dialysiert und das ausgefällte Kollagen in 600ml 0,1M Citrat-Puffer , pH 3,7 gelöst . Die Lösung wurde dann gegen mehrmals gewechseltes dest. Wasser eine Woche lang dialysiert . Das ausgefällte Kollagen wurde dann mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen und schließlich gefriergetrocknet : Rohkollage K_{1o} .

Kollagen K_{11} (Pepsingelöstes Kollagen) : Die Rückstände III nach der 0,15M Essigsäure-Extraktion wurden in 1000 ml 0,5M CH_3COOH , pH 2,9 , suspendiert . 0,3g Pepsin (Kollagen:Pepsin = 100 : 1) wurden der Suspension hinzugeführt (24 Std.) . Nach dem Zentrifugieren wurde die Lösung durch Nesseltuch filtriert . Die Lösung wurde dann bei 20000 x g , 30 Min. ultrazentrifugiert . Durch Dialyse gegen o,o1M Na_2HPO_4 wurde das Rohkollagen ausgefällt . Nach Zentrifugieren wurde das Präzipitat in 7ooml 0,1M CH_3COOH gelöst und abzentrifugiert . Nach Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 5% wurde das ausgefallene Kollagen wieder in 0,05M Tris/ 1M NaCl , pH 7,4 gelöst. Durch Zugabe von 5M NaCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 2,5M NaCl wurde das Kollagen wieder ausgefällt . Das Präzipitat wurde dann in 500 ml 0,1M Essigsäure gelöst , gegen dest. Wasser dialysiert und schließlich gefriergetrocknet : Rohkollagen K_{11} .

REINIGUNG

Alle Kollagen -Präparate wurden entweder über Fibrillen oder über Segmente umkristallisiert .

i) Umkristallisieren über Fibrillen :

Zur Reinigung des Kollagens durch Umkristallisieren wurde 0,5g gefriergetrocknetes Kollagen-Präparat in 5oo ml 0,1M Citrat - Puffer , pH 3,7 , gelöst und vom Nichtgelösten sorgfältig bei 4ooo x g , 30 Min . abzentrifugiert . Anschließend wurden gegen dest. Wasser eine Woche lang dialysiert und die ausgefallenen Fibrillen mehrmals mit bidest. Wasser gewaschen und gefriergetrocknet : (Kollagen - Präparate K_1 , K_2 .. usw.).

ii) Umkristallisieren über Segmente :

0,1 proz. Kollagenlösungen (0,1g gefriergetrocknete Kollagene gelöst in 100ml 0,05%ige Essigsäure) wurden gegen einen Überschuß 0,4% $ATPNa_2$- Lösung drei Tage dialysiert . Der pH-Wert (3,2) wurde vor der Dialyse in beiden Lösungen mit 0,1N HCl bzw. 0,1N NaOH eingestellt . Die gebildeten Segmente wurden bei 20000 x g , 20 Min. abzentrifugiert und mit 0,2 proz. $ATPNa_2$- Lösung des gleichen pH-Wertes mehrmals gewaschen . Nach Aufschlämmen der Segmente in 0,05% Essigsäure wurde zur vollständigen Entfernung des $ATPNa_2$ zwei Tage gegen 0,5M NaCl , anschließend wieder gegen o,05% Essigsäure dialysiert und danach gefriergetrocknet : (Kollagen- Präparate K_1S , K_2S ... usw.) .

9. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Untersuchungen über Chemie und Eigenschaften von Kollagenen aus Rinderplacenten angestellt. Humanplacenten sind nur für einige Versuchsreihen verwendet worden , und zwar , um den Zusammenhang zwischen Kollagen - und Vitamin C -- Gehalt menschlicher Placenten in Abhängigkeit vom Alter zu studieren .

Zur Untersuchung der Chemie und Eigenschaften löslicher Kollagene wurden mehr als 20 Präparate aus Rinderplacenten hergestellt , die sich in folgende drei Gruppen ordnen lassen :

I. Säurelösliche Kollagene durch Extraktion in saurem Bereich von pH 2,9 bis 3,7 (S. 33,137, 139,145) .

II. Neutralsalzlösliche Kollagene durch Extraktion im neutralen Bereich mit 0,2M oder 0,5M NaCl - Lösung (S. 30, 139, 140, 141).

III. Pepsingelöste Kollagene durch Extraktion im sauren Bereich ,pH 3,0, unter Zusatz von Pepsin (S. 33, 142, 144, 145, 146).

Durch Dialyse oder wiederwohlte Umfällung wurden die Kollagen-Extrakte von anderen Proteinen und Muccopolysacchariden gereinigt: Als Reinigungsoperationen dienten Umfällen über Fibrillen bzw. über Long-Spacing-Segmente (SLS) : S. 147.

Bei den zahlreichen Extraktionsversuchen an Rinderplacenten wurde festgestellt , daß die Extraktion durch Enzymzugabe zu wesentlich besseren Ausbeuten an löslichen Placenta-Kollagenen führt (S. 39).

Während es jedoch mit Trypsin , Pronase und Papain gelingt, einen Teil des unlöslichen Kollagens in eine lösliche Form zu überführen , vermag Pepsin bei 20-25°C im sauren Bereich , einen großen Teil des Placentakollagens in Form nativer Teilchen aufzulösen(S. 35).

Die Charakterisierung der hergestellten Placenta-Kollagene wurde hauptsächlich an säurelöslichen- und pepsingelösten -Kollagenen durchgeführt . Das neutralsalzlösliche Kollagen wurde verhältnismäßig wenig untersucht , da es sich nicht bedeutend vom säurelöslichen Kollagen unterscheidet . Die Unterschiede zwischen den beiden Arten von Kollagenen bestehen in intra- und intermolekularen Quervernetzungen (S. 106, 107 ; Abb. 40 , 41).

Einen Vergleich der Kennzahlen von säurelöslichen und pepsingelösten Kollagen gibt die Tab. 21.

Die verschiedene Placenta -Kollagen- Präparate wurden durch Anwendung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) charakterisiert :

Die über Fibrillen gereinigten säurelöslichen Kollagene zeigen im Elektronenmikroskop ein charakteristisches Querstreifungsmuster von ca. 640 Å (vgl. S. 61).

Die Fibrillen der pepsingelösten Kollagene erschienen gegenüber den von säurelöslichen Kollagenfibrillen etwas kontrastärmer. Dieser Effekt könnte auf einer Abtrennung von Begleitkomponenten durch Pepsineinwirkung beruhen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Segment-Long-Spacing-Kollagenen (SLS-Präparaten , S. 62) zeigen die charakteristische Querstreifungsperiode von 2400 - 2700 Å (S. 64) . Die pepsingelösten Kollagen-Präparate zeigen auch im Elektronenmikroskop gut strukturierte SLS (S. 66 , Abb. 17). Diese Segmente sind aber etwas kürzer (S. 67, Abb. 18b). Durch Pepsineinwirkung wurden die Teleopeptide abgespalten. Diese Abspaltung beträgt etwa 150 Å , was ca. 6% der gesamten Kollagenmoleküle entspricht . Dabei ergibt sich , daß die Begleitkomponenten, die durch Pepsinbehandlung abgespalten wurden , bei der Segmentbildung keine Rolle spielen .

Tabelle 21. Vergleich der Kennzahlen eines saurelöslichen und pepsingelösten Kollagens

KENNZAHLEN	Säurelösliches Kollagen K_1 (vgl. S. 137)	Pepsingelöstes Kollagen K_6 (vgl. S. 142)
1. Stickstoffgehalt (Gew%) (Tab. 8, S. 42)	16,96	16,60
2. Hydroxyprolingehalt (Gew%) (Tab. 8, S. 42)	11,80	12,80
3. Kohlenhydrat (Gew%) (Tab. 9, S. 45)	0,95	0,42
4. Tyrosin (Gew%) (Tab. 9, S. 45)	0,47	0,25
5. Hexosamin (Gew%) (Tab. 9, S. 45)	0,30	0,17
6. Hydroxyprolin, Prolin, Glycin und Alanin (Reste/1000) (S. 56)	665,40	673,15
7. Glycingehalt (Reste/1000) (S. 56)	333,20	339,56
8. Molekulargewicht (S. 86)	272000	256000
9. Viskositätszahl (dl/g) (S. 87)	13,2	12,0
10. T_m-Werte (°C) (S. 90)	35,4	32,9
11. Wiederlöslichkeit (S. 97) (Anteil gelöst in %)	78,1	92,0
12. Komponenten (S. 110)	drei	eins (α), zwei (α, β), oder drei (α, β, γ) (Je nach Versuchsbedingungen)
13. Sedimentatiskonstante (Svedberg) (S. 118)	2,47	2,43

Die Angaben früherer Autoren über die abgespaltete Länge der Tropokollagene verschiedener Provenienz , die durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen hervorgerufen wurden, streuen von 1 bis 10% (115 , 141).
Die Bildung von SLS-Moleküle von nativen Fibrillen kann man in den TEM-Aufnahmen erkennen (S. 67 u. 70). Der Zwischenzustand (Übergang der nativen Fibrillen zu Segmenten) wurde durch vorzeitige Einstellung der Dialyse festgehalten und im Elektronenmikroskop dargestellt . Die Bildung von Segmenten von der Fibrillen des nativen Typs ist deutlich zu erkennen . Es wurde dabei sichergestellt , daß Segment-Bildung von den Versuchsbedingungen bei der Ausfällung beeinflußt wird . Dabei spielen der pH-Wert der Lösung sowie die Dauer der Dialyse eine besondere Rolle (S. 68).
Außerdem wurde gefunden , daß sich durch Dialyse von Kollagenlösungen gegen $ATPNa_2$-Lösung die Segmente langsamer bilden als durch direkte Zugabe von $ATPNa_2$. Die durch Dialyse erhaltenen Segmente sind besser quergestreift und breiter (S. 68, Abb. 21,22).

Durch Anwendung von SEM auf die verschieden behandelten Placenta-Kollagene wurden verschiedene Oberflächenreliefs sowie der Bindungsgrad der Placenta-Kollagenfibrillen klar dargestellt (S. 73-74).
Das Kollagenpräparat K_1 zeigt im Rasterelektronenmikroskop ein Netzwerk feiner Kollagenfibrillen. In SEM-Aufnahmen erkennt man, daß mehrere zusammengelagerte Kollagenfibrillen zu einer Schicht ausgebildet sind . Ferner wurde festgestellt , daß ein nichthitzedenaturiertes Kollagenpräparat eine rauhe Oberfläche besaß , während ein hitzedenaturiertes Kollagen durch eine glatte Oberfläche gekennzeichnet war (S. 75).

Die Molekulargewichtsbestimmung von verschiedenen Placenta-Kollagenen erfolgte durch Anwendung von SDS-Gel-Elektrophorese. Die Molekulargewichtswerte von säurelöslichen Kollagenen liegen in der

Größenordnung von 272000-280000. Wie auch zu erwarten war, liegen die Werte für pepsingelöste Kollagene bei 256000-260000, da ja, wie bereits erwähnt, die Schwanzpeptide durch Enzymbehandlung abgespalten worden sind. Hierzu wurde auch eine Verkürzung der Tropokollagenmoleküle nach Pepsineinwirkung um ca. 6-6,5% ermittelt (vgl. S. 86).

Aus Bestimmung der Intrinsik-Viskositäten errechnet sich für die Viskositätszahl ein Mittelwert von 13,2 $\pm$ 1,5 für säurelösliche bzw. 12,0 $\pm$ für pepsingelöste Kollagene. Durch Viskositätsmessungen wurde festgestellt, daß die Begleitkomponenten des Kollagens die Aggregation der Moleküle beeinflussen (S. 87).

Durch Messung der optischen Drehung wurde nachgewiesen, daß die Drehwerte davon abhängen, ob das Kollagen in nativer oder denaturierter Form vorliegt. Sie betragen im nativen Zustand bei Natriumlicht etwa -370 bis -400 ^{o} für säurelösliche Kollagene und etwa -330 bis-360^{o} für pepsingelöste Kollagene (S. 87). Diese (zu erwartenden) niedrige Werte von optischen Drehungen der pepsingelösten Kollagene betreffen hierbei die Schädigung bestimmter Begleitkomponenten während des Pepsinangriffs, die als Ursache für die niedrigen Drehwerte angesehen wird.

Zur Überprüfung der thermischen Stabilität wurde die Denaturierungstemperatur der verschiedenen Placenta-Kollagene bestimmt. Während säurelösliches Kollagen ein Denaturierungstemperatur (T_m) von 35,4^{0}C beträgt, ergibt sich für pepsingelöstes Kollagen 32,9^{0}C (S. 90).

Bei der Ermittlung der T_m-Werte von löslichen Placenta-Kollagenen wurde nachgewiesen, daß Hydroxyprolinreiche Kollagene höhere T_m-Werte besitzen. Folglich ergab sich daraus, daß Hydroxyprolin einen Einfluß auf die Stabilität des Kollagenmoleküls ausübt (S. 92, Abb. 33). Im Laufe der Untersuchungen der thermischen Stabilität wurde außerdem festgestellt, daß die T_m-Werte von dem pH des Lösungsmittels abhängig sind. Dabei ergab sich eine nichtlineare Abhängigkeit der T_m-Werte von den pH-Werten der Lösungsmittel (S. 92, Abb. 32).

Die Rolle des Hydroxyprolins zur Stabilität des Kollagenmoleküls wurde weiter untersucht :

Durch Viskositätsmessungen und Untersuchung in Gel-Filtration wurde die Pronaseempfindlichkeit von zwei Placenta-Kollagenen mit unterschiedlichem Hydroxyprolingehalt verglichen. Es wurde dabei gefunden, daß die Enzymempfindlichkeit der beiden Kollagene dem Hydroxyprolingehalt proportional ist (S. 100).

Der Gefriertrockner wurde zur Untersuchung der Wasserbindefähigkeit bzw. zur Aufstellung der Sorptionsisothermen von säurelöslichen und pepsingelösten Kollagenen angewandt. Dabei ergab sich , daß pepsingelöstes Kollagen eine schwächere Bindefähigkeit besaß als säurelösliches Placenta-Kollagen (S. 103.).

Durch Sorptionsmessungen wurde festgestellt, daß mit zunehmendem Alter der Präparate eine Abnahme der Wasseraffinität zur Kollagenfaser besteht (S. 103).

Zur Trennung der Komponenten von löslichen Placenta-Kollagenen durch die Anwendung von Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese konnten die verschiedene Kollageneinheiten beobachtet werden :

Säurelösliche Kollagene treten in drei Hauptbanden auf. Die am schnellsten wandernde liegt als Dublett vor , (α_1 und α_2) , die etwas langsamer wandernde ist von einer schmalen Vorbande begleitet (β_{11} u. β_{12}). Es treten noch weitere, sehr schmale Banden in der Nähe der am langsamsten wandernden Hauptbande auf (γ-Polymere). Neutralsalzlösliches Kollagen zeigt dagegen nur eine Komponente (α-Komponente) (S. 107).

Die Komponenten der pepsingelösten Kollagene sind von den Versuchsbedingungen abhängig. Je nach Pepsinmenge und dauer der Extraktion konnten 3 (α , β , γ) , 2 (α , β) oder nur eine Komponente (α) beobachtet werden (S. 106 , 108 ; Abb. 42).

Die CNBr-Peptide der säurelöslichen und pepsingelösten Kollagene zeigten ein unterschiedliches Peptidmuster (S. 110 , Abb. 43).

Bei der Säulenchromatographie an CM-Cellulose wurde aus wärmedenaturiertem säurelöslichem Kollagen 2 Hauptkomponenten (α u. ß) erhalten . Pepsingelöstes Kollagen zeigt auch 2 Komponenten (S. 114 , Abb. 44 , 45) .

Die Sedimentationskonstante von den beiden Präparaten wurde unter Anwendung einer analytischen Ultrazentrifuge ermittelt . Es wurde dabei gefunden , daß die Kollagenlösung von pepsingelöstem Kollagen etwas niedrigere Sedimentationskonstante besaß als säurelösliche Kollagenlösung . Dieser kleine Unterschied könnte vielleicht auf eine Verkürzung des Kollagenmonomeren unter der Pepsineinwirkung hinweisen (S. 118).

Zur Aufklärung des Zusammenhanges zwischen Kollagen und Vitamin C in Humanplacenten wurden die beiden Inhaltsstoffe in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gravität bestimmt . Für die angegebene Zeit wurde ein linearer Anstieg der genannten Placenta-Inhaltsstoffe gefunden. Die Resultate stützen den obenaufgezeichneten Zusammenhang zwischen Kollagen und Vitamin C bei der Biosynthese dieses Eiweißkörpers. Im Gegensatz zu den Angaben der Literatur (3,10,19,39, 69,101, 104, 117,118,131,164) wurden bei Placenten sich entsprechenden Alters keine sehr großen Schwankungen der Vitamin C-Werte festgestellt (Tab. 20 , S. 134).

LITERATURVERZEICHNIS :

1. Abderhalden, R., Schweiz. med. Wschr. 26 (1945) 281
2. Abe, M., Japan J. obstet. Gynec. 15 (1932) 44
3. Ammon, R., Med. Welt . 12 (1938) 924
4. Ammon, R., Dircherl , W., Fermente- Hormone - Vitamine , Bd. III/1 , Georg Thieme Verlag , Stuttgart 1974
5. Arnaki , M., Klin. Wschr. (1956) 895 , ref. Ber. Ges. Gynäk. Geburtsh. , 61 (1957) 253
6. Arselmino , K. J., Preface du. Pr. P. Gerard (Masson, Paris) 1958
7. Athanassiu , G., Klin. Wschr. 24/25 (1946) 170
8. Baer , R.S., Adv. Protein. Chem. , 7 (1952) 69
9. Bailey , A. J., Comprehensive Biochemistry 26B (1968) 339
10. Barnes, A.C. et al. , Amer. J. Obstet. Gynec. 53 (1947) 645
11. Berendsen , H. J. C., J. Chem. Phys. 36 (1962) 3297
12. Berkovitsj , E. M., et al., Fiziol. Z. Mosk. 36 (1950) 214
13. Bischoff , C., et al ., Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 207 (1932) 57
14. Blix , G., Acta. Chem. Scand. 2 (1948) 467
15. Bornstein, P., Piez, K.A., Biochemistry . 5 (1966) 340
16. Bourne, G. L., Am. J. Obstet. Gynec. 79 (1960) 1070
17. Bradbury, E. M. et al ., Discuss - Faraday Soc. 25 (1958) 173
18. Brody, S., Preface du. Pr. P. Gerard (Masson, Paris) 1958
19. Buccellato, T., Gismondo, P., G. Obstet. Ginec. Catania 14 (1950) 257
20. Buddecke, E., Grundrisse der Biochemie , Walter de Gruyter & Co. Berlin , 1970
21. Chik , W. H., Dissertation , Freie Universität Berlin (1975)
22. Cramer , W., Lochhead , J., J. Physiol., London, 34 , XXIV (1906)
23. Da cunha , D. P., Arch. Gynäk. 124 (1925) 511
24. Davidek, et al ., Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 154 (1974) 18
25. Davidson , P. F., Drake, M. P., Biochemistry 5 (1966) 313
26. Dick , Y. P., Nordwig , A., Arch. Biochem. Biophys. 117 (1966) 466
27. Diczfallusy, E., Lindqvist, P., Acta. endochrin. Kbh. 22 (1956) 203 ref. Ber. ges. Physiol. 189 (1957) 238

29. Dory, P., Nishihara , T., Recent Advances in Gelatin and Glue Reasearch , Pergamon Press , London (1958)
30. Doyle, B.B. et al ., Biopolymers 14 (1975) 937
31. Drake , M.P. et al ., Biochemistry 5 (1966) 313
32. Dumont , M .,Karlin, R., Gynec . Obstet. 56 (1957) 56
ref. Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 63 (1956-57) 159
33. Ehrenberg, R., Liebenow ,W., Arch. ges. Physiol. 201 (1923) 387
34. Elson , L.A., Morgan , W.T.J., Biochem. J. 27 (1933) 1824
35. Engel , J., Arch. Biochem .Biophys. 97 (1962) 150
36. Fragner , J., Vitamine (Chemie und Biochemie) Vol.I , Jena Verlag , 1964
37. Fuchs , F., Fuchs, A.R., Acta Physiol. Scand. 89 (1957) 277
38. Fujimoto, D., Biochem. Biophys. Acta. 154 (1968) 183
39. Fujimoto, D., Biochem. J. 84 (1962) 333
40. Fujita, A., Ebihara, T., Biochem Z. 290 (1937) 182
41. Furthmayer, H., Timpl, R., Anal.Biochem. 41 (1971) 510
42. Gaddum, J.H., Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe, Thieme, Leipzig (1936)
43. Gaehtgens., G., Arch. Gynäk. 171 (1941) 390
44. Gaehtgens , G., Arch. Gynäk. 164 (1937) 588
45. Grassman , W., et al ., Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. 322 (1960) 71
46. Grassman, W., et al., Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. 324 (1961) 284
47. Grassman , W., et al., Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. 307 (1957) 87
48. Gross, E., Witkop, B., J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 1510
49. Gross, J., et al., Acad. Sci. 40 (1954) 679
50. Gross , J., et al., Arch. Biochem Biophys. Acta. 97 (1955a) 366
51. Gross, J., et al., Proc. natn.Acad.Sci. USA 41 (1955) 1
52. Gross, J., J. exp. Med. 107 (1958b) 265
53. Gustavson., K.H., Nature 175 (1955) 70
54. Hafter, R., Hörmann,H., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 330 (1963) 169

54. Hagermann, D.D., Villee , Cl.A., Preface du.Pr. P. Gerard (Masson, Paris) 1958
55. Harding , V.J., Fort , Ch. A., J. Biol. Chem. 35 (1918) 29
56. Harkness, M.L.R., Harkness, R.D., J. Physiol. 128 (1955) 225
57. Harrington, W.F., J. Mol. Biol. 9 (1964) 613
58. Haskins , A.L., J. Obstet. Gynec. 67 (1954) 330
59. Hauptstein. ,P., Arch. Gynäk., 151 (1932) 262
60. Herbage , D. et al., Biochem . J., 161 (1977) 303
61. Hildebrandt, A., Arch. Gynäk. 170 (1940) 540
62. Hodge , A. J., Schmitt , F.O. , Biochemistry 4 (1960) 186
63. Hoefke , W., Lüllmann , H., Arch. exp. Path. Pharmakol. 227 (1956) 519
64. Hoffmann , F., Preface du Pr. P. Gerard (Masson, Paris) 1958
65. Holzaefel, J.H., Barnes , A.C., Amer. J. Obstet. Gynec. 53 (1947) 864
66. Jackson , D.S., Fessler , J.H., Nature , Lond. 176 (1955) 69
67. Jafferey , J.J., Martins , G. R., Biochem. Biophys. Acta. 121 (1966)281
68. Kasabyan, S.S., Excerpt. med. Sect. X 10 (1957) 96
69. Kinnunen , O., Rauramo , L., Acta. Obstet. Gynäk. Scand. 24 (1945) 578
70. Kühn , K., et al ., Z. Naturforsch. 13b (1958) 154
71. Kühn , K., et al., Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. 338 (1964) 10
72. Kühn, K., et al., Hoppe- Seyler´s Z. Physiol. Chem. 326(1961) 50
73. Kühn, K., et al., Hoppe- Seyler´s Z. Physiol. Chem . 333 (1963b) 209
74. Kühn, K., et al., Naturwissenschaften 12 (1963a) 444
75. Kühn, K., et al., Biochemische Zeitschrift 344 (1966) 418
76. Kühn, K., Zimmer, E., Z. Naturforsch. 16b (1961) 648
77. Kyank, H., Zbl. Gynäk., 77 (1955) 1390
78. Kyank, H., Zbl. Gynäk., 79 (1957) 1633
79. Kyank, H., Schmidt , W., Zbl. Gynäk., 191 (1958) 26
80. Laufenberger , V., Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 30 (1936) 384
81. Leach , A.A., Biochem. J., 74 (1960) 384

82. Lipmann, W., Bergell, P., Münch. med.Wschr.52(1905)2211
83. Löb,W., Higuchi,S., Biochem.Z. 22 (1909) 316
84. Löffler,H., Weiss,P., Physiologische Chemie, Springer Verlag , Berlin,Heidelberg,New York (1975)
85. Løvell,D., et al. , J.Obstet.Brit.Cwlth. 74 (1967) 568
86. Luschinsky,H.L., Arch. Biochem.31 (1951) 132
87. Lust,J.E., et al , J.clin. Invest. 33 (1954) 38
88. Maeda , K., Biochem.Z . 143 (1923) 143
89. Mayer, A., Arch. Gynäk. 137 (1929) 1
90. Mckay , D.G. et al., Obstet. Gynec. N.Y. 12 (1958) 1
91. Masters , M., Clayton ,S.G., Preface du. Pr. Gerard (Masson, Paris) 1958
92. Mischel , W., Zbl. Gynäk. 78 (1956) 1089
93. Mischel , W., Arch. Gynäk. 190 (1958) 228
94. Mischel ,.W., Arch. Gynäk. 190 (1958) 8
95. Mischel , W., Z. Geburtsh. Gynäk. 150 (1958) 50
96. Mischel , W., Arch. Gynäk. 190 (1958) 384
97. Mischel , W., Arch. Gynäk. 191 (1959) 345
98. Mischel, W., Arch. Gynäk. 191 (1958) 101
99. Mischel , W., Arch. Gynäk. 191 (1958) 1
100. Mischel, W., Z. Geburtsh. 148 (1957) 149
101 . Møller, C.E. , et al ., Zbl. Gynäk. 64 (1940) 1858
102. Müller , F. , Z. Biol. 42 (1901) 561
103. Mugikulara , X., Tohuku J. exp. med. 62 (1955) 11
104. Muller , J., Klin. Wschr. 18 (1939) 299
105. Nogales , F., Botella Llusia , J., Excerpta. med. Sect. X , 11 (1958) 230
106. Nathan-Larrier ,et F., J. Physiol. Path. Gen.10 (1908)60
107. Nemetschek,Th. , Naturwissenschaften 58 (1968) 346
108. Neumann, R.E., Logan , M.A., J. Biol. Chem. 184(1950)299
109. Neurath ,H.,.The Proteins, Academic Press, (1965) 59

110. Neuweiler , W., Z. Vitaminforsch. 10 (1940) 40
111. Neuweiler , W., Z. Vitaminforsch. 12 (1941) 88
112. Neuweiler, W., Z. Vitaminforsch. 13 (1943) 275
113. Neuweiler , W., Z. Vitaminforsch. 18 (1946)74
114. Neuweiler , W., Z. Vitaminforsch. 12 (1942) 329
115. Neuweiler, W., Z. Vitaminforsch. 21 (1949) 83
116. Neuweiler, W., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 249 (1937) 225
117. Neuweiler, W., Schweiz. med. Wschr. 65 (1935) 539
118. Neuweiler, W., Acta. obstet. Gynec. Scand. 24 (1945)578
119. Nishihara, T., Miyata , T., Collagen Symp. 3 (1962)66
120. Noall, M.W., et al , J.biol.Chem. 201 (1953) 321
121. Orekhovich, V.N., Shpikiter, V.O., Biokhymiya 22(1958)285
122. Orekhovich, V.N., Shpikiter , V.O., Dokl. Acad. Nauk. SSR . 101 (1955) 529
123. Ortmann, R., Z. Anat.Entw.Gschw. 119(1955) 28
124. Pearlman, W.H., J.Biol.Chem. 203 (1953)127
125. Pearlmann, W.H., Cerceo, E., J.Clin.Endocrin.12(1952)916
126. Picinelli, G., Braga, A., Ann. Obstet.Ginec.63(1941)161
127. Piez, K.A., J.Biol. Chem. 239 (1964) 4315
128. Piez, K.A. et al ., Biochem. Biophys. Acta. 53 (1961)596
129. Piez, K.A. et al., Biochemistry 4 (1965) 2590
130. Piez, K.A., et al . , Biochemistry 2 (1963)58
131. Policard, H.A., Ferrand, M., Clin. Wschr. 16 (1937) 308
132. Pratt , J.P., et al ., Amer. J. Obstet. Gynec. 52 (1946) 783
133. Pratt, J. P. , et al ., Amer. J. Obstet.Gynec. 52 (1946) 402
134. Pratt, J.P. et al., Amer. J. Obstet. Gynec. 52 (1946) 665

135. Ramachandran, G.N., Treatise on Collagen , Academic Press, London , New York , 1967

136. Rauch , S. et al ., Helv. med. Acta. 23/A, (1956)75

137. Rice, V.R., et al ., Arch. Biochem. Biophys. 105(1964)409

138. Reich, G., Lagutke, H., Z. Chem. 3 (1963)67

139. Riemschneider, R., Mitt. Physiol. Chem. Inst. Bln. R1a, Juni, 1946 , u. spätere Mitt. der Reihe " Stoffwechselaktive Organextrakte "

140. Riemschneider, R., Zainal-Abedin, M., Mocellin, R. P., Alimenta, 15 (1976) 171

141. Riemschneider, R. , Chik, W. H., Angew. Makromol. Chem. 45 (1975) 151

142. Riemschneider, R., Chik, W.H., Deutsche Apotheker Zeitung 117 (1977) 1557

143. Riemschneider, R., Martins, A.F., Geburtsh. u. Frauenheilk. 37 (1977) 934

144. Riemschneider, R., Schulz. E., Unveröffentlichte Arbeiten (1974)

145. Roe, J.H., Kuether, C.A., J, Biol. Chem. 147(1943)399

146. Roe, J.H., Oesterling , M.J., J. Biol. Chem. 152(1944)511

147. Rubin, A.L., et al ., Biochemistry 4 (1965) 181

148. Salhanik , H.A., et al., Science 115 (1952) 708

149. Scheuner, G., Ruckhäberte, K.E., Zbl. Gynäk. 92(1970)732

150. Schleuer, M., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 329(1962)97

151. Smythe, C.V., King, C.G., J. Biol. Chem. 142 (1942) 529

152. Snoeck, J., Preface du Pr. P. Gerard (Masson, Paris)1958

153. Snoeck, J., Villee, Cl.A., Preface du Pr. P. Gerard (Masson, Paris) 1958

154. Speakmann, P.T., Nature 229 (1971) 241

155. Stark, G., Oswald, H., Klin. Wschr. 34 (1956) 461

156. Stefano, V., Franco, C., Boll. Soc, Biol. Sper. 23 (1947)953

157. Steven, F.S., Proc. 4. Europ, Symp. Basic. Res. In. Gerontology, 1973, ed. By Viid , K.A.

158. Sykes , B.C., Bailey, J., Biochem. Biophys. Res. Comm. 43 (1971) 340

159. Thomson, K.U., Panka, R., Arch. Gynäk. 188(1956)95

160. Tonutti, E., Platte, E., Arch. Gynäk. 62 (1938) 265

161. Udenfried, S., Cooper, J.R., J. Biol. Chem. 196(1952)227

162. Vandendriessche, R., Jaworski, Z., C.R. Soc. Biol. 143 (1949) 1289

163. Verbeck , J.H. et al ., Amer. J. Obstet. Gynec. 99(1967)1136

164. Wachholder, K., Podesta, H.H., Hoppe-Seylerś Z. Physiol. Chem. 239 (1936) 149

165. Weber, K., Methods of Enzymology, N.Y. Vol. XXVI(1972)

166. Weber, K., Osborne, M., J. Biol. Chem. 244(1969)4469

167. Wehefritz, E., Arch. Gynäk. 127 (1926)106

168. Wehefritz, E., Arch. Gynäk. 124 (1925) 511

169. Wehefritz, E., Gierhake , E ., Klin. Wschr. 10(1931)505

170. Wehefritz, E., Hartmann, W., Klin. Wschr. 30 (1952) 474

171. Wille, R., Ber. ges. Gynäk. Geburtsh. 62(1957) 347

172. Wolff, G., Ärtzl. Praxis, 4 (1952) 1

173. Zainal-Abedin, M., Dipolmarbeit : " Vitamin C—Gehalt von verschieden vorbehandelten Kartoffeln".

LEBENSLAUF

Am 1. Nov. 1946 wurde ich in Comilla , Bangladesh , als Sohn des Schriftsetzers Mohammad Muslim und seiner Ehefrau Ashrafunnessa , geb. Begum , geboren . Meine 1953 begonnene Schulzeit schloß ich in Comilla in Mai 1963 mit der Schulabschlußprüfung ab. Nach Intermediate Science in Chittagong (1965) Chemiestudium an der Universität Chittagong mit Erwerben des Grades Bachelor of Science (B. Sc. Hons. , 1968) . 1970 legte ich die Master of Science-Prüfung (M. Sc.) von der Universität Dacca. Anschließend Tätigkeit als Chemie-Lehrer an das Rangamati Govt. College in Chittagong. Seit dem 1. Okt. 1972 erhalte ich dankend ein Stipendium von dem DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) und studiere ich an der Freien Universität Berlin . Nach Ablegung der Dipolmprüfung am 10. Sept. 1975 begann ich unter der Leitung meines Doktorvaters , Herrn Professor Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider , meine Doktorarbeit .

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Prof. Dr.: G. Bourwieg, W. Franke , R. Frydrych, J. Fuchs, W. Hirschwald, G. Koßmehl, G. Manecke , G. Marx, I. Pernoll, E. Riedel, R. Riemschneider , G. Ruban , W. Wendling, A. Willgallis .